



UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
LICENCIATURA EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

MIDIAN NASCIMENTO MARTILIANO DE OLIVEIRA

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DOS EXTRATOS
ETANÓLICOS DE *SARGASSUM VULGARE* AGARDH (MAC 51236) E *ULVA
LACTUCA* LINNAEUS (MAC 51238).**

MACEIÓ-AL
2021

MIDIAN NASCIMENTO MARTILIANO DE OLIVEIRA

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DOS EXTRATOS
ETANÓLICOS DE *SARGASSUM VULGARE* AGARDH (MAC 51236) E *ULVA
LACTUCA* LINNAEUS (MAC 51238).**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à
Coordenação do Curso de Graduação em
Ciências Biológicas da Universidade Federal
de Alagoas (UFAL) como requisito parcial
para obtenção do grau de licenciatura em
Ciências Biológicas.

Orientador: Prof. Dr. Renato Santos Rodarte.

MACEIÓ-AL
2021

Catálogo na Fonte
Universidade Federal de Alagoas
Biblioteca Central
Divisão de Tratamento Técnico

Bibliotecário: Marcelino de Carvalho Freitas Neto – CRB-4 – 1767

- O48a Oliveira, Midian Nascimento Martiliano de.
Avaliação da atividade antimicrobiana dos extratos etanólicos de *Sargassum vulgare* Agardh (MAC 51236) e *Ulva lactuca* Linnaeus (MAC 51238) / Midian Nascimento Martiliano de Oliveira. - 2021.
46 f. : il.
- Orientador: Renato Santos Rodarte.
Monografia (Trabalho de Conclusão de Curso em Ciências Biológicas: licenciatura) – Universidade Federal de Alagoas. Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde. Maceió.
- Bibliografia: f. 42-46.
1. *Sargassum vulgare*. 2. *Ulva lactuca*. 3. Anti-infecciosos. I. Título.

CDU: 582.272:582.263.1

FOLHA DE APROVAÇÃO

MIDIAN NASCIMENTO MARTILIANO DE OLIVEIRA

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DOS EXTRATOS ETANÓLICOS DE *SARGASSUM VULGARE* AGARDH (MAC 51236) E *ULVA LACTUCA* LINNAEUS (MAC 51238).

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à Coordenação de Graduação em Ciências Biológicas Licenciatura da Universidade Federal de Alagoas (UFAL) e aprovado em 21 de dezembro de 2021.



Documento assinado digitalmente
Renato Santos Rodarte
Data: 03/02/2022 11:40:10-0300
Verifique em <https://verificador.iti.br>

Prof. Dr. Renato Santos Rodarte (Orientador)

Banca Examinadora:



Documento assinado digitalmente
Maria Danielma dos Santos Reis
Data: 03/02/2022 12:02:18-0300
Verifique em <https://verificador.iti.br>

Prof.^a Dr.^a Maria Danielma Santos Reis



Documento assinado digitalmente
TAYHANA PRISCILA MEDEIROS SOUZA
Data: 04/02/2022 12:04:57-0300
Verifique em <https://verificador.iti.br>

Prof.^a M.Sc. Tayhana Priscila Medeiros Souza

Dedico este trabalho a minhas amadas filhas,
Ana Laura e Maria Luísa, por serem a fonte de
energia que me impulsiona a buscar meus
objetivos.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar a Deus por estar sempre comigo renovando minhas forças mesmo diante de tantos obstáculos.

A meu esposo Whanderson Silva Soares pelo companheirismo de sempre, pelo apoio nas horas difíceis e pelo suporte sempre que precisei.

A meus pais Joselito Martiliano de Oliveira e Zeneide Nascimento dos Santos, pelo incentivo, por não me deixarem desistir durante essa longa jornada.

A minha irmã Thayná Milena Ferreira Santos e cunhada Wevillyn Silva Soares, pelo auxílio nos momentos em que precisei.

Ao meu orientador Prof. Dr. Renato Santos Rodarte pelos ensinamentos e orientação, por sua dedicação, paciência e conhecimentos que adquiri.

Aos alunos e professores dos laboratórios de Biologia Celular e Molecular – UFAL em especial Tayhana e Simone que me ensinaram tanto.

A professora Regianne Kamiya, por me oferecer, mais que o espaço e os materiais, mas também atenção, e conhecimento. E a todos os seus alunos que me acolheram como se fizesse parte da equipe, em especial a Nathalie, gratidão pelo companheirismo e apoio durante a pesquisa.

Aos meus colegas de turma no Curso de Ciências Biológicas Licenciatura em especial minhas amigas Simone, Clarice e Carol pela amizade, companheirismo, puxões de orelha e por fazerem minhas tardes mais leves.

A Prof. Dra. Élica Amara Cecília Guedes por ceder os extratos de algas utilizados na pesquisa.

Aos professores do Curso de Ciências Biológicas Licenciatura que contribuíram para minha formação.

Enfim, a todos aqueles que contribuíram direta ou indiretamente para minha formação acadêmica.

“O coração do homem traça o seu caminho, mas o SENHOR lhe dirige os passos”

Provérbios 16:9

RESUMO

Em razão do aumento de microrganismos resistentes a antimicrobianos e do número de doenças de origem infecciosa, tem se intensificado a busca por substâncias de origem natural que possam ser candidatas a novas drogas com efeito antimicrobiano. O mar por sua diversidade se mostra um fornecedor em potencial de tais substâncias. As algas em especial são destacadas pela quantidade de compostos secundários únicos, produzidos como forma de defesa as condições adversas oferecidas pelo ambiente aquático. Atividades biológicas diversas são atribuídas a duas espécies de algas encontradas na costa marítima alagoana, propriedades antiangiogênica, antitrombótica, anticoagulante, antioxidante, antitumoral e antimicrobiana são relatadas na literatura para a espécie *Sargassum vulgare*, bem como anticoagulante, anticarcinogênica, antiproliferativa, antiviral, antioxidante, anti-hipertensiva, anti-inflamatória para *Ulva lactuca*, fato este que motivou o presente estudo. Visando conhecer o potencial dos extratos etanólico bruto das referidas algas contra doze cepas hospitalares com perfis de resistência à antibióticos, foi utilizada a técnica de microdiluição em caldo. Os resultados demonstraram que as cepas gram-positivas são mais sensíveis a ação dos extratos, como *Staphylococcus aureus* 187, que chegou a ter sua viabilidade reduzida em 53% quando tratada com *Ulva lactuca* na concentração de 500 µg/ml. Já *Streptococcus sanguinis* 15300 chegou ao percentual de inibição de 75,38%, quando tratada com a maior concentração (500 µg/ml) do extrato de *Sargassum vulgare*. As cepas de bactérias gram-negativas, no entanto não apresentaram sensibilidade ou apresentaram de forma moderada, apenas *Pseudomonas aeruginosa* 03 e *Acinetobacter baumannii* 21 apresentaram resultados estatisticamente relevantes quando tratados com *Sargassum vulgare* e *Ulva lactuca* nas concentrações de 15,62 µg/ml e 250 µg/ml, 500µg/ml respectivamente. Os extratos de *Sargassum vulgare* e *Ulva lactuca*, demonstram potencial como agente antibacteriano contra cepas de microrganismos resistentes aos antibióticos, outros ensaios como o de prospecção fitoquímica podem indicar quais substâncias estão mais presentes nos extratos, podendo, a partir daí, levantar hipóteses sobre as vias que estariam agindo.

Palavras-chave: *Sargassum vulgare*. *Ulva lactuca*. Antimicrobiano.

ABSTRACT

Despite of the increase in the antimicrobial resistant microorganisms and the number of infectious diseases, the search for substances with natural origins that could be candidates for new drugs with an antimicrobial effect has been intensified. The sea, due to its diversity, is a potential supplier of such substances. Algae in particular are highlighted by the amount of unique secondary compounds, produced as a means of defense against the adverse conditions offered by the aquatic environment. Several biological activities are attributed to two species of algae found on the coast of Alagoas, antiangiogenic, antithrombotic, anticoagulant, antioxidant, antitumor and antimicrobial properties are reported in the literature for the species *Sargassum vulgare*, as well as anticoagulant, anticarcinogenic, antiproliferative, antiviral, antioxidant, antihypertensive, anti-inflammatory for *Ulva lactuca*, a fact that motivated the present study. Aiming to know the potential of the crude ethanol extracts of these algae against twelve hospital strains with antibiotic resistance profiles, the broth microdilution technique was used. The results showed that gram-positive strains are more sensitive to the action of extracts, such as *Staphylococcus* spp 187, which had its viability reduced by 53% when treated with *Ulva lactuca* at a concentration of 500 µg/mL. *Streptococcus sanguinis* 15300, on the other hand, reached an inhibition percentage of 75.38%, when treated with the highest concentration (500 µg/mL) of the *Sargassum vulgare* extract. The gram-negative bacterial strains, however, did not show sensitivity or showed moderately. Only *Pseudomonas aeruginosa* 03 and *Acinetobacter baumannii* 21 showed statistically relevant results when treated with *Sargassum vulgare* and *Ulva lactuca* at concentrations of 15.62 µg/mL and 250 µg/mL, 500 µg/mL respectively. The extracts of *Sargassum vulgare* and *Ulva lactuca* demonstrate potential as an antibacterial agent against strains of microorganisms resistant to antibiotics, other tests such as the phytochemical prospection may indicate which substances are more present in the extracts, and may, from there, raise hypotheses about the pathways who would be acting.

KEYWORDS: *Sargassum vulgare*. *Ulva lactuca*. Antimicrobial.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	9
2. REVISÃO DE LITERATURA	11
2.1 Histórico sobre o uso de recursos naturais para fins medicinais	11
2.2 Considerações sobre a resistência bacteriana	14
2.4 Aspectos gerais sobre as espécies de <i>Sargassum</i>	18
2.5 Aspectos gerais sobre as espécies de <i>Ulva</i>	20
3. OBJETIVOS	24
3.1 Objetivo geral	24
3.2 Objetivos específicos:	24
4. METODOLOGIA	25
4.1 Extratos	25
4.2 Microrganismos	25
4.3 Teste de sensibilidade à agentes antimicrobianos - Método de Microdiluição em Caldo	25
4.3.1 Plaqueamento dos extratos	26
4.3.2 Ajuste da concentração bacteriana	26
4.4 Plaqueamento dos microrganismos	26
4.5 Análise Estatística	27
5. RESULTADOS	28
6. DISCUSSÃO	37
7. CONCLUSÃO	41
8. REFERÊNCIAS	42

1. INTRODUÇÃO

O Planeta Terra é majoritariamente coberto por água, um ecossistema detentor de uma variedade imensurável de organismos. Dentre estes, destacamos as algas, não só pela sua variedade, mas também pela sua contribuição para a estabilidade e equilíbrio do ecossistema, pois são produtoras de oxigênio, são fonte de alimento, têm participação na mineralização e no ciclo dos elementos químicos e ainda atuam como bioindicadores de poluição. Assim, as algas cumprem papel ecológicamente similar ao de plantas terrestres (VIDOTTI; ROLLEMBERG, 2004; LAVRADO, 2006).

As algas podem ser encontradas em diversos ambientes, terrestre (onde haja umidade suficiente), em relações de epifitismo (associadas a outros organismos), superfície de neves e geleiras. Mas, em sua maioria, as algas têm hábitos aquáticos, podendo existir em estuários, rios, lagos, mangues ou mares, onde podem fazer parte dos fitobentos, quando estão fixas a um substrato (ex. costões rochosos), ou dos fitoplanctons, quando vivem livres na coluna d'água (ex. recifes de maré) (PAULA, 2007). Sua ocorrência em determinado ambiente está relacionada à sua capacidade de resistir aos fatores bióticos e abióticos deste. Por sofrerem grandes variações de umidade, temperatura, sazonalidade, salinidade, disponibilidade de nutrientes, luz e carbono, as algas desenvolvem estratégias de adaptação e defesa, produzindo compostos metabólicos únicos, capazes de obter respostas biológicas eficientes. Dessa forma, as algas marinhas representam uma fonte potencial de novos compostos bioativos, como por exemplo a chlorellin, um metabolito obtido da microalga *Chlorella vulgaris* com comprovada ação antimicrobiana, as macroalgas como: *Padina gymnospora* e espécies de *Sargassum* também demonstraram ser capazes de inibir o crescimento bacteriano e fúngico. (RAVEN, 2014; DENIS *et al.*, 2010; SOUZA 2013; SYED; ARASU; PONNUSWAMY, 2015; MANIVANNAN *et al.*, 2011).

Em contrapartida, faz-se cada vez mais necessário encontrar novos compostos com potencial farmacológico, especialmente nos casos das enfermidades que já esgotaram suas fontes terapêuticas disponíveis, como é o caso da resistência bacteriana a antimicrobianos. Segundo estudo publicado em 2015 pela revista *The Lancet*, mais de 33.000 (trinta e três mil) europeus morrem por ano vítimas de infecção por bactérias resistentes. Este problema representa uma das principais ameaças à saúde, não só na Europa, mas em todo o mundo (CASSINE *et al.*, 2015).

Diante disto, o presente estudo buscou avaliar o potencial antimicrobiano dos extratos etanólicos das algas *Sargassum vulgare* e *Ulva lactuca* frente a cepas de bactérias gram-positivas e gram-negativas.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Histórico sobre o uso de recursos naturais para fins medicinais

O ser humano sempre fez uso de recursos naturais para prover suas necessidades. E apesar de nos dias atuais termos tomado conhecimento de que a biodiversidade (plantas, fungos, insetos, organismos marinhos e bactérias) é uma fonte de substâncias com propriedades farmacológicas, as plantas foram precursoras, no interesse por produtos naturais, como recurso terapêutico para tratamento de doenças (GARCIA, 1985; BARREIRO e BOLZANI, 2009; GURIB-FAKIM, 2006). De início, o conhecimento a respeito de tais benefícios era empírico, ou seja, através da observação humana, avaliava-se o comportamento das plantas e da interação destas com o meio. Dessa forma, descobriam-se espécies com maior ou menor toxicidade, que eram posteriormente testadas, podendo apresentar potencial terapêutico ou não. Este conhecimento era repassado às gerações seguintes (CUNHA, 2005).

Na antiguidade, várias civilizações possuem relato do uso de plantas no tratamento e na cura de doenças. Os primeiros registros datam de 2.600 (dois mil e seiscentos) anos antes da era cristã, são placas de barro escritas em cuneiforme, documentos sumérios e babilônicos que destacam as propriedades medicinais de aproximadamente 250 (duzentas e cinquenta) espécies vegetais, entre elas a cássia, cedro, alcaçuz, mirra, papoula e cardamomo (MONTEIRO; BRANDELLI, 2017).

Na China, 2.698 a.C., o imperador Shen-nung descreveu em seu cânone, intitulado *pen ts'ao ching*, a primeira matéria médica oficial da história chinesa com 365 (trezentos e sessenta e cinco) medicamentos, 237 (duzentos e trinta e sete) originados de plantas. O próprio Shen-nung fez uso de mais de 100 (cem) espécies para testar seu valor medicinal (HOU, 1977).

No Egito, o uso de plantas era comum para os mais diversos fins, na alimentação, como cosmético, como vermífugo, purgante, diurético. Mas, principalmente, para embalsamar os mortos. Para isso, ervas com propriedades aromáticas e antissépticas eram utilizadas. Apesar de a medicina egípcia ser voltada para a magia e religião, os papiros de Erbs, que catalogou 125 (cento e vinte e cinco) plantas medicinais e 811 (oitocentas e onze) receitas (1.550 a.C.), relatava a quais tratamentos estava indicado cada medicamento, como também descrevia a constituição de cada um, atribuindo às ervas as propriedades terapêuticas (MONTEIRO; BRANDELLI, 2017).

No mundo clássico referido, as civilizações gregas e romanas ainda relacionavam as doenças à causa divina, entretanto foi o povo grego que começou a questionar a origem das

doenças e atribuí-las às causas naturais. O período que compreendeu os anos de 500 a.C. a 200 d.C., segundo Cavalcante (2019), foi considerado os anos dourados da fitoterapia do mundo ocidental, época em que Plínio, Hipócrates, Aristóteles, Teofrasto, Dioscórides e Galeno estudaram, classificaram e atribuíram propriedades curativas a centenas de plantas. Neste período, várias obras médicas de muita importância foram escritas, sendo a de Hipócrates “*Corpus Hipocraticum*” a que mais se destaca por sua completude e clareza, e a de Dioscórides “*De Matéria Médica*”, que ilustrou cerca de 600 (seiscentas) plantas, descrevendo a utilidade medicinal de muitas delas. Essas obras foram consideradas referências ocidentais para o uso de plantas medicinais até o período do renascimento (MONTEIRO; BRANDELLI, 2017).

Com a queda do império romano ocidental e início da Idade Média, houve uma estagnação dos estudos acerca das propriedades curativas das plantas, isto porque a cultura clássica e o conhecimento grego e romano foi se perdendo, restando apenas poucos escritos incompletos em latim (LIBERATO, 2008). A igreja era avessa ao conhecimento científico, assim, as plantas medicinais ganharam cunho religioso, os unguentos preparados a partir destas eram destinados a curas espirituais, e não físicas (CUNHA, 2005). Entretanto, Constantinopla preservou suas fontes de conhecimento originais e, apesar de não ter avançado na medicina, o império bizantino teve um importante papel, herdando, conservando, comentando e transmitindo obras da antiguidade grega. E, ao mesmo tempo em que sofria influência dos diferentes povos com os quais tinham contato por causa da favorável localização (entre Ásia e Europa) e do próspero comércio, o império bizantino difundia seu conhecimento helênico no oriente entre os sírios, persas e, principalmente, árabes e no ocidente (GIORDANI, 2001).

O retrocesso da Idade Média foi, de certa forma, compensado pelos árabes. Na medicina, essa civilização buscava encontrar novas substâncias com potencial terapêutico através dos conhecimentos de alquimia e técnicas químicas, acrescentando novas fórmulas terapêuticas e técnicas de armazenamento destas ao conhecimento helênico (BASSO, 2004). Como na enciclopédia medico-botânica intitulada “*Corpus simplicium medicamentarium*”, no qual o médico árabe Ibn Al Baitar incorporou aos conhecimentos clássicos a experimentação árabe, caracterizando mais de 2.000 (dois mil) produtos dos quais cerca de 1.700 (mil e setecentos) eram de origem vegetal (CUNHA, 2005). A tradição médica do mundo islâmico tem muitos nomes que contribuíram com a ciência farmacêutica, sendo o mais famoso e influente deles Abu Ali ibn Sina também conhecido como Avicena (980 – 1037). Da sua volumosa obra, destaca-se o cânone de medicina, que reuniu uma lista de substâncias

terapêuticas, o livro que seguia a vertente helênica de Hipócrates e Galeno possuía 5 (cinco) volumes, 2 (dois) deles dedicados à medicina, tornou-se referência em muitas universidades europeias (ROSA, 2012).

No renascimento, o empirismo deu lugar ao questionamento, à investigação e à experimentação, o pensamento científico banido desde a época helênica foi então retomado. No entanto, não houve grandes avanços da fármaco-botânica na primeira fase do renascimento, limitando-se a seguir os ensinamentos da antiguidade clássica. Nesse período, obras de autores como Teofrasto e Dioscórides foram traduzidas, publicadas e republicadas (CUNHA, 2005; LIBERATO, 2008).

O estudo das plantas só foi retomado no século XVI, período em que vários autores de grande importância surgiram. Embora todos tivessem como alvo de estudo as plantas, em sua maioria as obras tinham a finalidade de descrever, ilustrar e criar métodos de classificação. Os primeiros a retomarem tais estudos, Otto Brunfels, Jerônimo Bock e Leonhard Fuchs ficaram conhecidos como os pais alemães da botânica. Algumas destas obras tinham também como enfoque as propriedades curativas de plantas, como: *De historia stirpium commentarii insignes* (1542), do já citado médico luterano Leonhard Fuchs, seu compêndio de ervas medicinais continha excelentes ilustrações, descrições detalhadas e um diferencial: o glossário. As plantas eram apresentadas em ordem alfabética, acompanhadas de informações como forma, habitat, propriedades e melhor época para colheita; ou *A New Herball*, de William Turner, considerado um marco na história da botânica e da fitoterapia, ou ainda a farmacopeia intitulada de *Antidotarii Bononiensis Epitome* (1574), em que o naturalista Ulisse Aldrovandi descreveu ingredientes e propriedades de várias drogas. Nos anos seguintes, várias farmacopeias medievais foram editadas, o que encorajou o cultivo de plantas medicinais em mosteiros e centros universitários, surgindo os primeiros jardins botânicos (ROSA, 2012).

Aos poucos, novos fármacos eram introduzidos à terapêutica, ao passo que viajantes de diversas nacionalidades partiam para lugares desconhecidos, na Ásia, África, e América, e puderam expandir seus conhecimentos da natureza e suas propriedades terapêuticas. Os portugueses destacam-se em sua contribuição pela abundância e diversidade de informações que divulgaram, entretanto, a divulgação de tais conhecimentos era lenta, e até muitas vezes consideradas segredo de Estado (LIBERATO, 2008; ROSA, 2012).

No Brasil, a utilização de plantas medicinais é anterior à colonização, os índios, através dos pajés, já utilizavam uma variedade de ervas em seus rituais de cura. Com a chegada e conseqüente exploração dos europeus, esse conhecimento foi absorvido e

aprimorado. Os escravos africanos também têm parcela de contribuição para a construção desse conhecimento, por meio das ervas que trouxeram consigo utilizadas em seus rituais religiosos. Dessa forma, a história da utilização de plantas medicinais no Brasil sofreu influências marcantes das culturas africana, indígena e europeia (TOMAZZONI; NEGRELLE; CENTA, 2006).

Na Idade Moderna, as pesquisas fármaco-botânicas tomaram um rumo diferente, não se buscava apenas relacionar as plantas com a cura das enfermidades. Pesquisadores, guiados pelo conhecimento já consagrado pelo uso popular buscavam detectar os princípios ativos que lhes conferia tais propriedades. Assim, novas substâncias bioativas foram conhecidas e incorporadas ao uso terapêutico. Um exemplo foi a descoberta dos salicilatos a partir da *Salix alba*, que representou um dos marcos para o desenvolvimento de fármacos a partir de plantas. Edward Stone, através de suas observações, atribuiu ao extrato da planta propriedades analgésicas e antipiréticas, mas foi só em 1828, quando Johann A. Buchner isolou a salicina, que os metabólitos de origem vegetal passaram a ser vistos com maior interesse e como fonte promissora de novos medicamentos (VIEGAS; BOLZANI; BARREIRO, 2006).

Com o avanço tecnológico, a busca por novas drogas terapêuticas passou a ser planejada, e as plantas que eram protagonistas no tratamento de várias enfermidades deram espaço aos medicamentos sintéticos. O descobrimento do AAS (ácido acetil salicílico) foi outro marco da história farmacológica, seguido do surgimento do barbitol, da epinefrina, da procaína e da benzocaína. No período pós-guerra, os fármacos sintéticos ficaram ainda mais em evidência após o surgimento de outros medicamentos como: anti-histamínicos, antipsicóticos, antidepressivos. Assim, o interesse por plantas medicinais e seu uso era visto como ultrapassado (VIEGAS; BOLZANI; BARREIRO, 2006).

A cultura do tratamento de doenças por fontes naturais vem sendo valorizada, pois o uso de recursos naturais tem ganhado preferência de boa parte da população (TOMAZZONI *et al.*, 2006). De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS, 2006), 80% da população de países em desenvolvimento utilizam práticas tradicionais nos cuidados à saúde, e 85% destas utilizam plantas e preparações para este fim.

2.2 Considerações sobre a resistência bacteriana

As bactérias são um dos organismos mais antigos, com evidências encontradas em rochas de 3,8 bilhões de anos. Estão nos mais diversos ambientes do planeta, bem como no interior de organismos, fazendo parte da sua microbiota, desempenhando importante papel no sistema de seu hospedeiro. No entanto, esse mesmo microrganismo pode assumir diferentes

papeis, como comensalista, mutualista ou tornando-se até mesmo um parasita (PIMENTEL; DIONÍSIO; SIGNOR, 2016; COGEN; NIZET; GALLO, 2008).

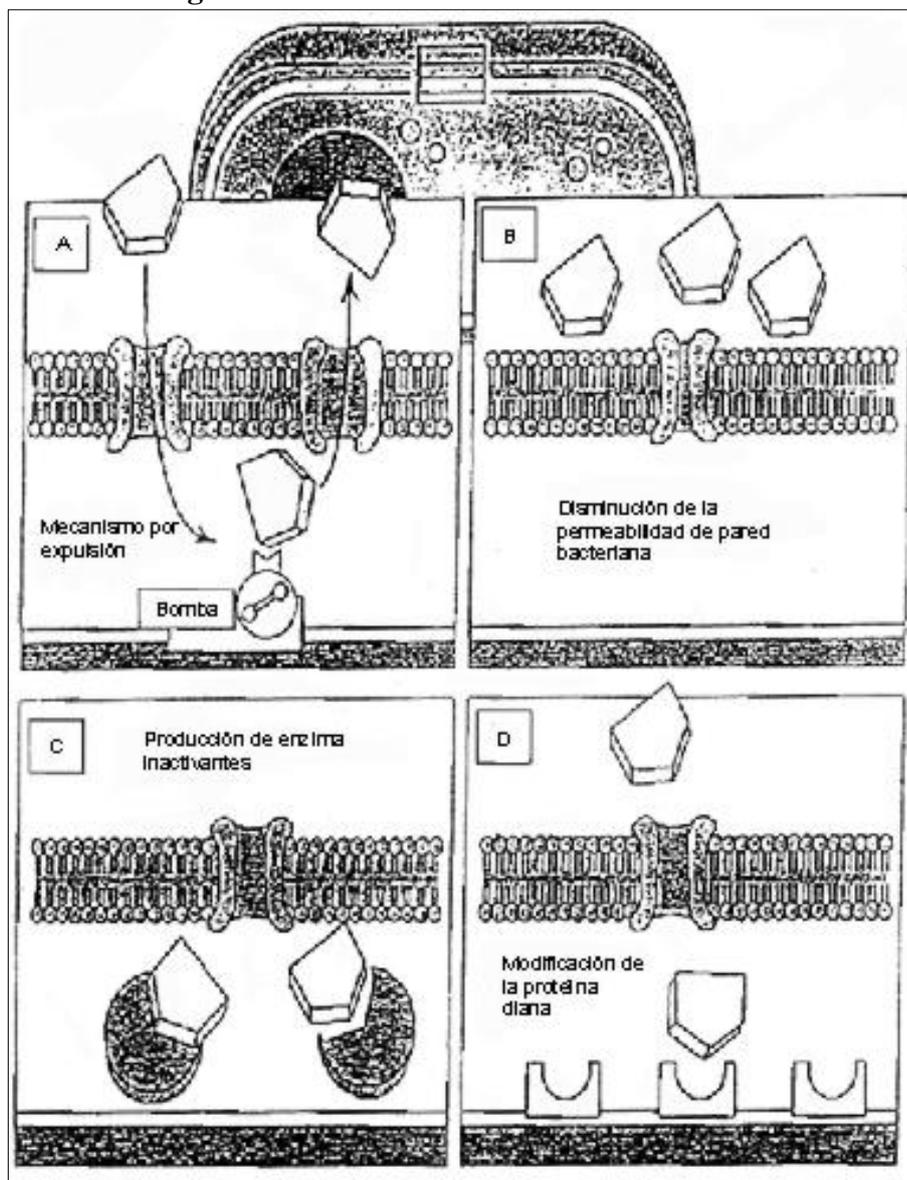
Os microrganismos patogênicos podem ser adquiridos pelo hospedeiro de diversas formas, como a ingestão de água e alimentos ou através do contato com objetos ou indivíduos contaminados. A descoberta dos antibióticos foi um marco para o tratamento de doenças causadas por esses microrganismos, permitindo tratar, de forma eficaz, infecções agudas e crônicas reduzindo drasticamente o número de mortes causadas por estas. Entretanto, infecções por bactérias patogênicas ainda podem provocar doenças de alta gravidade, especialmente nos casos em que o microrganismo demonstra algum nível de resistência (MALACRIDA; DIAS; LIMA, 2017; FRANCO *et al.*, 2015). “A resistência é entendida como o mecanismo pelo qual a bactéria pode diminuir a ação dos antimicrobianos” (RIVERÓN *et al.*, 2003).

A resistência pode ser consequência natural da capacidade de adaptação, o que é conhecido como resistência natural ou intrínseca e é anterior ao advento dos antibióticos, entretanto o uso indiscriminado destes, inclusive em casos em que não são indicados, seleciona e oportuniza a criação de mecanismo de resistência em bactérias antes sensíveis, desta forma se dá a resistência adquirida ou extrínseca como é o caso da *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA), *Streptococcus pneumoniae* não susceptível à penicilina (PNSSP), Enterococcus resistente à vancomicina (VRE). Para adquirir resistência deve haver alteração no material genético da bactéria, através da indução de mutação, na sequência das bases dos cromossomos, neste caso a resistência é transmitida verticalmente de uma geração a outra, ou pela introdução de material genético extra cromossômico de outras bactérias, No segundo, a transferência gênica é realizada horizontalmente por meio de plasmídeos ou outro material genético móvel, como integrons e transposons, permitindo a transmissão para outras gerações e também para outras espécies, assim a resistência pode se propagar rapidamente, o que agrava ainda mais a situação (RIVERÓN *et al.*, 2003; SILVEIRA *et al.*, 2006).

As bactérias desenvolveram vários mecanismos para resistir à ação dos antibióticos. Podendo ocorrer através de bomba de efluxo, pela expulsão do antimicrobiano (Fig. 1a), pela alteração da parede bacteriana, com modificação ou perda dos canais de entrada (Fig. 1b), inativação ou modificação do antibiótico através da produção de enzimas de inativação (Fig. 1c) e/ou pela modificação da proteína alvo, pela produção de enzimas ou até mesmo pela inibição de sua síntese (Fig. 1d). Frequentemente bactérias podem utilizar mais de uma

estratégia para evitar a ação dos antibióticos, assim a ação conjunta destes mecanismos podem acentuar ainda mais o nível de resistência (GIEDRAITIENĖ *et al*, 2011).

Figura 01 – Mecanismos de resistência bacteriana



(a) Expulsão do antimicrobiano, (b) alteração de permeabilidade da parede bacteriana, (c) inativação do antibiótico, (d) modificação da proteína alvo.
Fonte: Riveron, *et al.*, (2003).

Além do aumento do número de bactérias resistentes aos antibióticos já conhecidos, vários novos microrganismos são identificados graças ao avanço das pesquisas microbiológicas, de forma que os antibióticos hoje conhecidos muito em breve podem se tornar ineficientes. Nesse sentido, a resistência antimicrobiana tornou-se uma das principais ameaças à saúde em todo o mundo. Segundo dados do relatório apresentados em reunião pela IACG (*Interagency Coordination Group on Antimicrobial Resistance*), 700.000 (setecentas mil) pessoas morrem todos os anos vítimas de infecções por microrganismos resistentes

(O'NEILL, 2016), trazendo preocupação às autoridades governamentais, comunidade médica, civil e acadêmica.

Esforços têm sido direcionados à implementação de medidas preventivas, a fim de alcançar um decréscimo no número de infecções, bem como protocolos adotados no intuito de diminuir o aparecimento de bactérias antibiótico-resistentes no ambiente hospitalar. A comunidade científica, por sua vez, tem dedicado esforços na busca por novos compostos que apresentem amplo espectro de ação e baixa toxicidade, sendo apto a se tornar uma terapia alternativa para o tratamento de infecções bacterianas. (SILVEIRA *et al.*, 2006; SANTOS, 2004).

2.3 O potencial farmacológico marinho

O Planeta Terra tem mais de 70% da sua superfície coberta por água, sendo 97,5% desta salgada, representadas pelos mares e oceanos (FENICAL; JENSEN, 2006; NEWMAN; CRAGG, 2016). Rico em diversidade biológica e química, o ambiente marinho oferece condições adversas de habitação. Fatores como competitividade por nutrientes e espaço, mudanças drásticas de temperatura, salinidade, exposição solar e radiação, tolerância ao dessecação, ação das ondas e pressão atmosférica podem influenciar o metabolismo desses organismos, produzindo como forma de defesa metabólitos secundários, que muito se diferem dos produzidos por organismos terrestres. Essas substâncias peculiares, ao tempo que contam com grande diversidade de alvos moleculares, também possuem alta afinidade com as moléculas alvo (FELICIO; OLIVEIRA; DEBONSI, 2012).

Apesar de haver relatos que datam 1.500 a.C. do uso de macroalgas marinhas no tratamento de doenças como: gota, fístula e de alguns tipos de câncer, o despontar para o interesse pelos produtos naturais marinhos se deu muito recentemente, na década de 50, quando o pesquisador Werner Bergmann identificou os nucleosídeos espongouridina e espongotimidina da esponja *Tethya crypta*, estas substâncias serviram de base para a criação de análogos sintéticos que originou novos fármacos, como o antiviral vidarabina (adenina arabinosídeo) também chamado de Ara-a e comercializado como thilo®, o antineoplásico citarabina® (citosina arabinosídeo) também chamado de Ara-c e comercializado como alexan e udicil, e o antiviral Zidovudina (azitotimidina) também chamado de AZT e comercializado como retrovir, e zidovir®. Mas foi só no ano de 1978, quando Alfred J. Weinheimer e Robert L. Spraggins descobriram grande quantidade de prostaglandinas no octocoral *Plexaura homonalla*, que os produtos naturais marinhos foram vistos realmente com potencial para se tornarem novos fármacos. Os anos seguintes foram de muitas descobertas, mais de 25.000

(vinte e cinco mil) novos produtos naturais foram descritos entre os anos de 1965 e 2006, enquanto que aproximadamente 18.500 (dezoito mil e quinhentas) substâncias foram isoladas no mesmo período, um total ínfimo se levarmos em consideração que isso corresponde a apenas 3% da riqueza marinha (GUEDES, 2011; FELICIO; OLIVEIRA; DEBONSI, 2012; NEWMAN; CRAGG, 2016; LOTUFO *et al.*, 2009).

A natureza é fonte abundante de substâncias com potencial terapêutico para diversas doenças, no entanto o processo entre a descoberta até a aprovação de um fármaco de origem natural é demasiadamente caro (cerca de 900 milhões de dólares) e demorada (em média 15 anos). Contudo, os produtos naturais, principalmente os marinhos, vêm despertando novamente o interesse de grandes indústrias farmacêuticas, sendo algumas companhias fundadas especificamente com objetivo de desenvolver protótipos de medicamentos oriundos de organismos ou microrganismos marinhos, frequentemente em busca de substâncias com potencial para o tratamento de câncer, já que tais substâncias apresentam alvos moleculares relevantes no tratamento da doença. Treze novos fármacos baseados em produtos naturais marinhos foram aprovados entre 2005 e 2007, sendo que cinco representam novas classes. O primeiro a obter autorização de introdução no mercado foi o Ziconotídeo, comercializado como Prialt®, seguido de outros como o anticâncer [ara-C (Citarabina®) e trabectedina (Yondelis®)], antiviral [ara-A (Vidarabina®)] e a Eribulina (Halaven®), um potente antineoplásico indicado no tratamento de câncer de mama metastático (LOTUFO *et al.*, 2009; BHATNAGAR; KIM, 2010).

Fauna, flora e microrganismos marinhos já demonstraram, através do conhecimento compilado em diversos estudos, produzir metabólitos com diversificada bioatividade, podendo representar potenciais fontes de compostos antibacterianos, anti-helmínticos, anticoagulantes, antifúngicos, anti-inflamatórios, antimaláricos, anticancerígenos, antiparasitários, antivirais e fotoprotetor. Ademais, os produtos naturais marinhos são compostos de alto valor, extremamente interessantes para aplicações na indústria farmacêutica (BHATNAGAR; KIM, 2010).

2.4 Aspectos gerais sobre as espécies de *Sargassum*

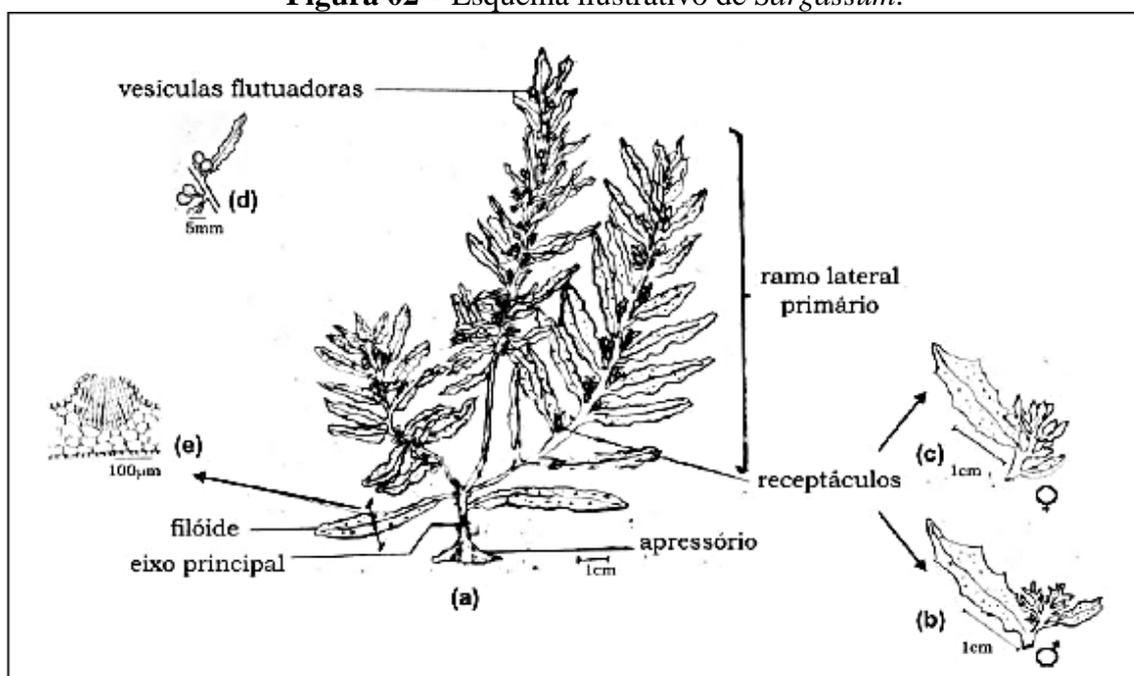
Sargassum é um dos mais representativos gêneros de macroalgas da ordem Fucales, pertence à família Sargassaceae e a classe Phaeophyceae. Também conhecida como algas pardas, é encontrada predominantemente em áreas costeiras presas a substratos, em regiões tropicais e subtropicais, onde podem formar os famosos bancos de *Sargassum* (COIMBRA, 2006). Atualmente, verifica-se a existência de 537 (quinhentas e trinta e sete) espécies deste

gênero. Dentre estas, 361 (trezentas e sessenta e uma) são aceitas taxonomicamente (GUIRY, 2015).

No gênero *Sargassum*, indivíduos adultos possuem, em sua estrutura, eixo principal fixado por um apressório; ramos laterais primários, que crescem indeterminadamente e se ramificam, os ramos mais desenvolvidos diferenciam-se em receptáculos (estruturas reprodutivas), que, por sua vez, diferenciam-se em conceptáculos, nos quais estão contidos os anterídios e/ou oogônios, ramos laterais secundários e ramos laminares denominados filóides; e algumas espécies podem apresentar vesículas flutuadoras (aerocistos) e cavidades com poros que podem conter estruturas semelhantes à pelos (figura 2) (COIMBRA, 2006).

Economicamente, são amplamente utilizadas na indústria alimentícia, pelas propriedades viscosas de seus alginatos, como, por exemplo, as espécies *Sargassum Carpophyllum*, *Sargassum ilicifolium* e *Sargassum siliculosum* (ZUBIA; PAYR; DESLANDES, 2008). Ecologicamente, têm importante papel, pois são capazes de acumular metais pesados tóxicos, providos de poluição humana, funcionando assim como um biofiltro. Outras espécies ainda, além de serem consumidas na alimentação, apresentam uso medicinal, como é o caso da espécie *Hizikia fusiformes* que possui capacidade de inibir a toxicidade por acetaminofeno (HWANG; KIM; NAM, 2008).

Figura 02 – Esquema ilustrativo de *Sargassum*.



(a) Desenho esquemático de um *Sargassum* com três ramos laterais; (b) aspecto dos receptáculos masculinos; (c) aspecto dos receptáculos femininos; (d) vesículas flutuadoras ou aerocistos; (e) aspecto do corte transversal do filóide na região do criptostomas. Fonte: Coimbra *et al.*, 2006; Paula, 1988.

No Brasil, são encontrados dezessete táxons pertencentes ao subgênero *Eussargassum* ou apenas *Sargassum*. São eles: *Sargassum acinarum* (L) Setchell, *Sargassum cymosum* var. *cymosum* C. Agardh, *Sargassum cymosum* var. *nanum*, *Sargassum filipendula* var. *filipendula* C. Agardh, *Sargassum filipendula* C. Agardh var. *montagnel* (Baley) Grunow, *Sargassum filipendula* C. Agardh var. *pinnatum* Grunow, *Sargassum filipendula* C. Agardh var. *Laxum* J. Agardh, *Sargassum furcatum* var. *furcatum* Kützinger, *Sargassum hystrix* J. Agardh, *Sargassum platycarpum* Montagne, *Sargassum polyceratium* Montagne, *Sargassum ramifolium* Kützinger, *Sargassum rigidulum* Kützinger, *Sargassum stenophyllum* (Mertens) Martius, *Sargassum vulgare* var. *vugare* C. Agardh, *Sargassum vulgare* var. *falisissimum* (Lamouroux), *Sargassum vulgare* var. *nanum* (COIMBRA, 2006).

Dentre as espécies de *Sargassum*, encontra-se a *Sargassum vulgare*. Em estudo realizado por Dore (*et al.*, 2012) foi encontrada na mesma através de extração em acetona, predominantemente o polissacarídeo sulfatado fucana, que demonstrou no mesmo estudo possuir alta ação antitrombótica, prolongando o tempo de tromboplastina parcial ativada, pronunciada atividade sequestrante do radical DPPH, como também exibiu forte ação antiinflamatória em modelo de edema de pata, reduzindo o edema e a infiltração celular. Outros estudos também relatam na espécie os potenciais antiangiogênico, antitrombótico, anticoagulante, antioxidante e a ação antitumoral, chegando a inibir 47% da viabilidade em células de tumor cervical da linhagem (HeLa). Também demonstrou ter ação apoptótica precoce e tardia na linhagem celular derivada de endotélio de aorta de coelho (RAEC), bem como atividades antimicrobianas contra diferentes cepas de bactérias multirresistentes (SHIMAA; SAM; MOSTAFA, 2019), sugerindo então ser um promissor alvo de estudos.

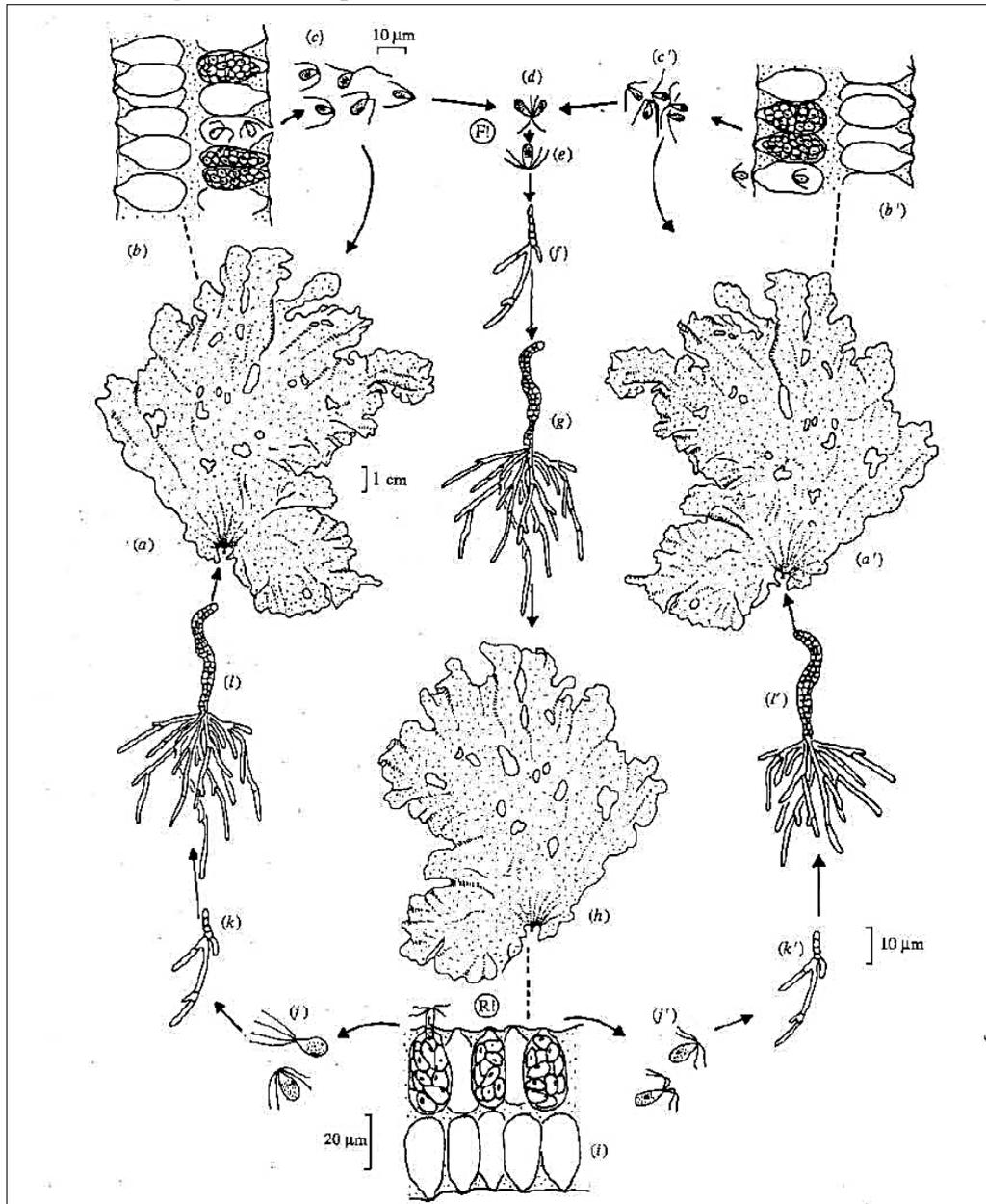
2.5 Aspectos gerais sobre as espécies de *Ulva*

Ulva é um gênero de macroalgas pertencente à divisão Chlorophyta, classe Ulvophyceae, ordem Uvales, família Ulvaceae (GUIRY; GUIRY, 2011). Podem ser encontradas em quase toda a costa mundial, sendo assim considerada cosmopolita (HO, 1990). Também é considerada oportunista, pois, ao colonizarem um substrato, desenvolvem-se e reproduzem-se rapidamente. Devido à sua morfologia especialmente adaptável, apresenta vantagens fisiológicas em situações de estresse ambiental, como tolerância a variações de luz (SAND-JENSEN, 1988; VERMAAT; SAND-JENSEN, 1987), temperatura e salinidade (LARTIGUE *et al.*, 2003; LITTLER, 1980).

No que diz respeito à morfologia, a diversidade fenotípica de alguns gêneros da ordem Uvales, como é o caso do gênero *Ulva*, tornaram a taxonomia morfológica insuficiente para identificar certas espécies. Algumas características antes utilizadas como forma de identificação interespecífica, como número de pirenídes, formas e disposição das células, espessura e presença de ramificações no talo, mostraram-se conflitantes nas descrições de diversos autores, muito provavelmente graças à sua capacidade de adaptação às variáveis do ambiente. Assim, marcadores moleculares tornaram-se uma ferramenta complementar na identificação de certas espécies (PUPO; COTO, 2011).

De acordo com Coto e Pupo (2011), verifica-se a existência de 890 (oitocentas e noventa) espécies do gênero. Destas, 200 (duzentas) são encontradas no Brasil, incluindo *Ulva lactuca*. Os indivíduos dessa espécie apresentam talo laminar membranáceo com bordas onduladas, inteiras ou lobadas, estando aderido ao substrato por meio de curtos rizóides que se conectam ao opressório discoide (estrutura de fixação). As frondes são largas e lisas, de uma coloração verde translúcida, assemelhando-se a folhas de alface. Por tal semelhança, a alga é popularmente conhecida como alface-do-mar. Em corte transversal, apresentam bicamada de células quadráticas, com cloroplasto parietal e de um a três pirenídes (PEREIRA, 2009; PACHECO, 2011). O ciclo de vida é diplobionte, apresentando alternância de gerações isomórficas com gametas anisogâmicos (figura 3) (PAULA *et al.*, 2007; HOEK; MANN; JAHNS, 1995).

Figura 03 – Esquema ilustrativo do ciclo de vida da *Ulva*



O ciclo de vida *Ulva lactuca*. (a, a') gametófitos achatados em forma de lâmina. (b, b') divisão do conteúdo celular em gametas biflagelados; estes são desiguais, sendo a cópula ansinogâmica. (c) gametas femininos. (c') gametas masculinos. (d) cópula ansinogâmica. (e) plano-zigoto quadriflagelado. (f) unisseriado. O esporófito (h) produz zoósporos quadriflagelados (j e j'), que germinam para produzir os gametófitos (a e a'), que produzem células biflageladas (c e c') que podem funcionar como gametas (reprodução sexual) ou zoósporos (reprodução assexuada). Não há reprodução vegetativa neste gênero.

Fonte: Hoek; Mann; Jahns, (1995).

A importância ecológica de *Ulva lactuca* está bem definida. A espécie se mostrou eficiente bioindicadora de poluição, além de ser um biofiltro, importante na remoção de poluentes, principalmente em ambientes contaminados com formas nitrogenadas (BONANNO; VENEZIANO; PICCIONE, 2020). Seu potencial econômico está diretamente relacionado à sua sensibilidade a contaminantes, já que promete ser um importante e lucrativa

ferramenta na remoção dos resíduos de efluentes da indústria ou de fazendas aquícolas (VANDERMEULEN; GORDIN, 1990; NEORI *et al.*, 2004). Também é usado na composição de rações para animais, como fertilizante orgânico na agricultura e na produção de biogás (PAGAND, 1999). Por sua riqueza em nutrientes, como hidratos de carbono, fibras, minerais (zinco e ferro), vitaminas (C, B1, B9 e E), proteínas, aminoácidos, as algas representam uma boa opção para a nutrição humana (DOMINGUEZ; LORET, 2019).

Ulva lactuca, em especial, tem a concentração de metais pesados dentro dos valores admitidos para ser uma alga comestível, mostrando-se rica em vitamina C, carotenoides, como o betacaroteno, e polifenóis, como também em nutrientes, como polissacarídeos (gomas, mucilagens e amido), proteínas e quinonas (ABIRAMI e KOWSALYA, 2011).

No que diz respeito ao potencial farmacológico, as espécies de *Ulva* demonstraram possuir compostos com atividades biológicas diversas, como alguns compostos fenólicos e polissacarídeos, entre eles a apigenina, um flavonoide que já mostrou possuir múltiplas funções terapêuticas, como ação apoptótica intrínseca e extrínseca, capacidade de induzir a parada do ciclo celular em diferentes estágios de proliferação, também demonstrou possuir função anti-inflamatória, antioxidante, antitumoral, antidiabética, hepatoprotetora e cardioprotetora, ademais de mostrou ser uma candidato promissor no tratamento de pacientes com Alzheimer (WEKRE, *et al* 2019; SALEHI, *et al* 2019). Entre os polissacarídeos destaca-se o Ulvano, que já mostrou ser capaz de inibir o crescimento de células cancerosas, possui propriedade anticoagulante, anticarcinogênica, antiproliferativa, antiviral, antioxidante, anti-hipertensiva, anti-inflamatória, anticoagulante, dentre outras. (KARNJANAPRATUM, 2011; EL BAKY, 2009; KAEFFER, 1999; IVANOVA *et al*, 1994).

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Estudar *in vitro* as atividade antimicrobiana de extratos de macroalgas da costa brasileira.

3.2 Objetivos específicos:

- Avaliar a atividade antimicrobiana dos extratos etanólicos de *S. vulgare* e *U. lactuca*;
- Determinar a concentração inibitória mínima às diferentes linhagens bacterianas testadas;
- Avaliar a atividade dos extratos, descobrindo seu percentual de inibição sobre bactérias resistentes a antibióticos.

4. METODOLOGIA

Os ensaios foram realizados no Laboratório de Biologia Celular e Molecular – LBCM, em colaboração com o Laboratório de Microbiologia do Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal de Alagoas.

4.1 Extratos

Foram utilizados neste estudo dois extratos etanólicos brutos de *Sargassum vulgare* Agardh (MAC 51236) e *Ulva lactuca* Linnaeus (MAC 51238), que foram obtidos com a prof.^a Dr.^a Élica Amara Cecília Guedes do Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde (ICBS). No processo para a obtenção dos extratos, as algas foram lavadas com água destilada, secas em estufa de ar circulante (BLUE MOD 140 1440 SC, USA) a temperatura de 45°C por cinco horas e trituradas em liquidificador industrial (modelo tipo TA-2, Brasil), após isto, amostras de 500g de alga seca foram suspensas em 1.000 mL de etanol e maceradas por 72 horas, sendo o processo repetido por três vezes. Os extratos orgânicos foram filtrados e rotoevaporados (Rotevaporador Buchii Heating Bath-B490, Switzerland a 25° a 40°C (GUEDES, 2011).

4.2 Microrganismos

Nos testes foram utilizadas doze cepas bacterianas coletadas de pacientes em tratamento no hospital universitário prof. Alberto Antunes e identificadas internamente por números que se seguem aos nomes das espécies, sendo quatro gram-positivas, *Staphylococcus aureus* (146 e 187), *Streptococcus mutans* (CP2), *Streptococcus saguinis* (15300), e oito gram-negativas: *Pseudomonas aeruginosa* (01 e 03), *Acinetobacter baumannii* (23 e 259), *Pseudomonas aeruginosa* (2 181 e 2 296) e *Acinetobacter baumannii* (21 e 56). As cepas foram conservadas em meio de cultura BHI (brain heart infusion) contendo glicerol, ou *Skim milk* (20% (p/v) de leite desnatado em pó dissolvido em água destilada) e mantidas a temperatura de -20°C até seu uso.

4.3 Teste de sensibilidade à agentes antimicrobianos - Método de Microdiluição em Caldo

Para determinar a atividade antimicrobiana dos extratos foi utilizado o método de microdiluição, com base na técnica descrita no documento M7-A8 do CLSI (*Clinical and*

Laboratory Standards Institute), (CLSI, 2009) técnica esta designada como padrão para validação de substâncias com atividade antimicrobiana pela OPAS e ANVISA.

4.3.1 Plaqueamento dos extratos

Nos testes foram utilizadas placas de 96 poços. Para a diluição dos extratos foram adicionados 100 µL de DMSO nos poços da 2ª a 12ª coluna, 200 µL dos extratos de *Sargassum vulgare* e *Ulva lactuca* previamente preparados (1mg/mL) foram adicionadas aos poços da 1ª coluna, em seguida foi feita a diluição seriada até a décima coluna, retirando 100 µL do poço de maior concentração para o poço seguinte, chegando as seguintes concentrações: 500 µg/mL; 250 µg/mL; 125 µg/mL; 62,5 µg/mL; 31,25 µg/mL; 15,62 µg/mL; 7,31 µg/mL; 3,90 µg/mL; 1,95 µg/mL (figura 4).

4.3.2 Ajuste da concentração bacteriana

As cepas previamente congeladas em meio de cultura BHI (brain heart infusion) contendo glicerol, ou *Skim milk* (20% (p/v) de leite desnatado em pó dissolvido em água destilada), foram descongeladas em temperatura ambiente, homogeneizadas em 2 mL do meio de cultura BHI (*Brain Heart Infusion*) e condicionadas em estufa durante 24 horas à 35 °C, verificado o crescimento bacteriano através da turvação do meio, uma amostra de cada cepa foi estriada em placas de Petri contendo o meio seletivo correspondente a seu grupo, sendo Agar Cetrimide (KASVI), Agar Manitol (BD), Agar Macconkey (KASVI) e Agar Mueller Hinton (HIMEDIA), para *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Acinetobacter baumannii*, *Streptococcus spp.* Respectivamente e em seguida foram novamente condicionadas em estufa à 35 °C por mais 24 h.

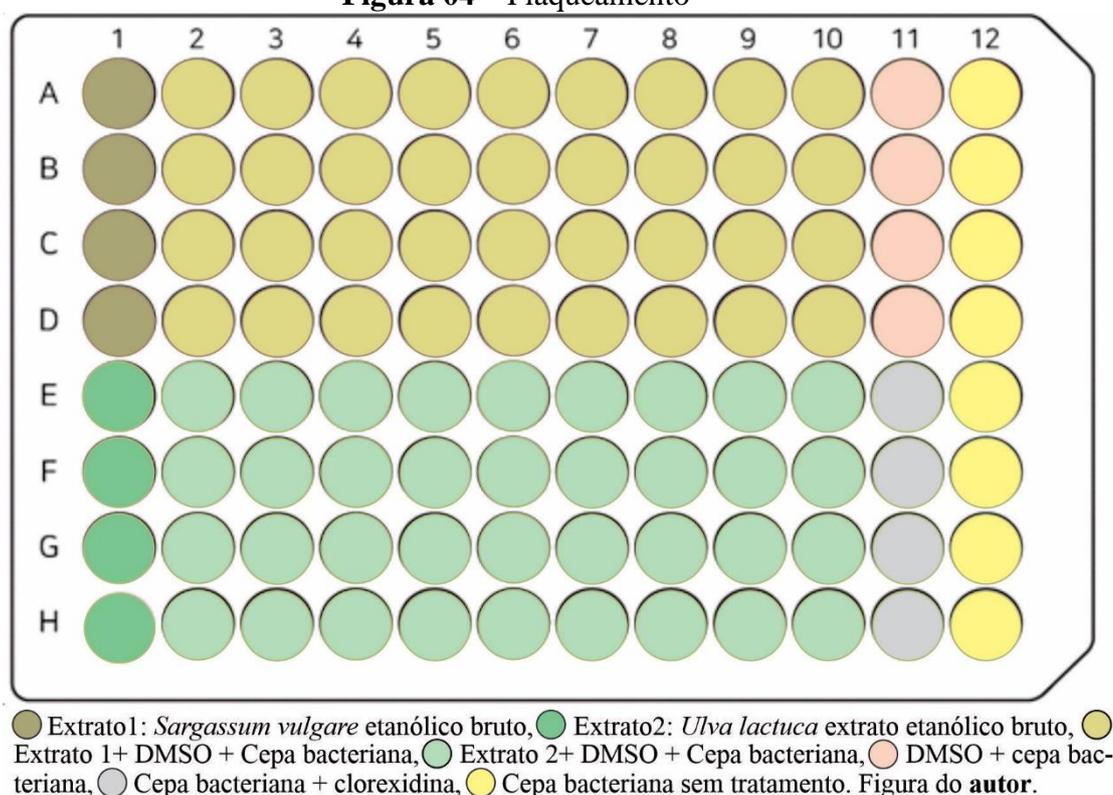
Na preparação do inóculo, as colônias bacterianas crescidas foram transferidas para um tubo de ensaio contendo solução salina (NaCl 0,9%) alcançando uma suspensão com turvação equivalente a escala 0,5 de Mac Farland $1,5 \times 10^8$ UFC/mL, da suspensão foram então realizadas mais duas diluições decimais em solução salina e por último em caldo Mueller Hinton (KASVI) até a obtenção da concentração final de 10^5 UFC/mL.

4.4 Plaqueamento dos microrganismos

O plaqueamento das cepas foi realizado, adicionando 100µL da suspensão do inóculo em cada poço, da segunda à décima coluna, nos quatro primeiros poços da décima primeira coluna foi adicionado DMSO, que foi utilizado como veículo e por isso testado para

confirmação de que não influencia a inibição da viabilidade bacteriana, nos quatro últimos poços da décima primeira coluna foram adicionados 100 μL de clorexidina 2% escolhido como controle antimicrobiano por ser capaz de eliminar tanto bactérias gram-positivas quanto gram-negativas, na décima segunda coluna, destinada ao controle negativo foi adicionado apenas os microrganismos sem tratamento (figura 4). Foram realizadas duas leituras em espectrofotômetro com comprimento de onda de 630 nm, sendo a primeira logo após o término do plaqueamento e a 2ª após 24 hrs de incubação em estufa a 37°C. A CIM (concentração inibitória mínima), que é definida como a menor concentração da droga capaz de inibir o crescimento microbiano, foi determinada observando a ausência de turvação visível, juntamente com os resultados obtidos na segunda leitura das microplacas.

Figura 04 – Plaqueamento



4.5 Análise Estatística

Os resultados foram representados como média e erro padrão da média (EPM) e avaliados estatisticamente através da análise de variância (*One-Way ANOVA*) seguido pelo teste de comparações múltiplas de Student-Newman-Keuls com um nível de significância selecionado para $p < 0.05$ utilizando o *software* GraphPad Prism 5[®].

5. RESULTADOS

Inicialmente foi realizada uma triagem com quatro cepas gram-positivas e quatro gram-negativas, a CIM (Concentração Inibitória Mínima) foi determinada como a menor concentração do tratamento capaz de inibir o crescimento bacteriano. Assim de acordo com os dados apresentados na tabela 1 e 2 pode-se detectar quais cepas se mostraram mais sensíveis ao tratamento com os extratos de *Sargassum vulgare* e *Ulva lactuca*.

Tabela 1 - Concentração Inibitória Mínima ($\mu\text{g/ml}$) dos extratos etanólico bruto de *Sargassum vulgare* e *Ulva lactuca* contra cepas de bactéria gram-positivas.

Microrganismos	CIM ($\mu\text{g/ml}$)	
	SVEB	ULEB
<i>S. aureus</i> 187	$\geq 1,95 \mu\text{g} / \text{ml}$	$\geq 1,95 \mu\text{g} / \text{ml}$
<i>S. aureus</i> 146	$\geq 1,95 \mu\text{g} / \text{ml}$	$\geq 1,95 \mu\text{g} / \text{ml}$
<i>S. mutans</i> 06	$\geq 1,95 \mu\text{g} / \text{ml}$	$\geq 1,95 \mu\text{g} / \text{ml}$
<i>S. sanguinis</i> 15300	$\geq 1,95 \mu\text{g} / \text{ml}$	$\geq 1,95 \mu\text{g} / \text{ml}$

SVEB: *Sargassum vulgare* etanólico bruto, ULEB: *Ulva lactuca* etanólico bruto, CIM: concentração inibitória mínima.

Tabela 2 - Concentração Inibitória Mínima ($\mu\text{g/ml}$) do extrato etanólico bruto de *Sargassum vulgare* e *Ulva lactuca* contra cepas de bactéria gram-negativas.

Microrganismos	CIM ($\mu\text{g/ml}$)	
	SVEB	ULEB
<i>P. aeruginosa</i> 01	$\geq 1,95 \mu\text{g} / \text{ml}$	$\geq 1,95 \mu\text{g} / \text{ml}$
<i>P. aeruginosa</i> 03	$\geq 1,95 \mu\text{g} / \text{ml}$	$\geq 1,95 \mu\text{g} / \text{ml}$
<i>A. baumannii</i> 23	NDA	NDA
<i>A. baumannii</i> 259	NDA	NDA

SVEB: *Sargassum vulgare* etanólico bruto, ULEB: *Ulva lactuca* etanólico bruto, CIM: concentração inibitória mínima, NDA: Não ocorreu inibição.

De acordo com os dados apresentados na tabela 1, as quatro cepas Gram-positivas testadas apresentaram algum grau de inibição desde a menor concentração. Já das quatro cepas Gram-negativas testadas, duas apresentaram uma inibição desde a menor concentração, no entanto esta inibição foi discreta não podendo ser considerada significativa, assim podemos concluir preliminarmente que as cepas Gram-positivas se mostraram mais sensíveis, enquanto que as cepas Gram-negativas se mostraram mais resistentes ao tratamento com os extratos. A fim de confirmarmos o perfil resistente substituímos as cepas Gram-negativas por outras quatro cepas. Os resultados podem ser observados na tabela 3.

De acordo com os resultados representados na tabela 3 pode-se confirmar que as cepas gram-negativas apresentaram menor sensibilidade aos extratos testados, já que apenas *Acinetobacter baumannii* ssp. 21 apresentou uma leve inibição nas concentrações de 125 µg/ml e 250 µg/mL para *S. vulgare* e *U. lactuca* respectivamente.

Tabela 3 - Concentração Inibitória Mínima (µg/ml) dos extratos etanólico bruto de *Sargassum vulgare* e *Ulva lactuca* contra cepas de bactéria gram-negativas.

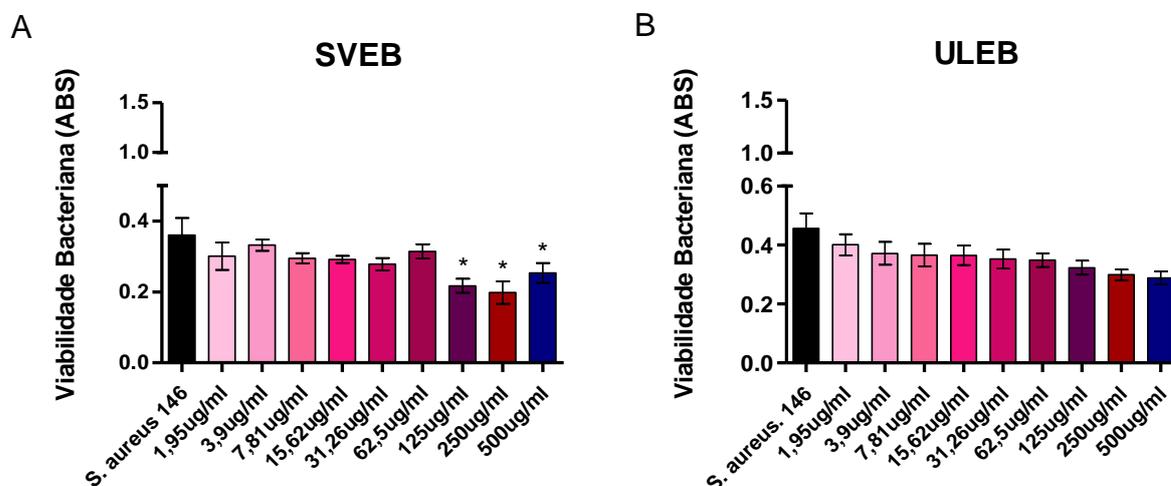
Microrganismos	CIM (µg/ml)	
	SVEB	ULEB
<i>P. aeruginosa</i> 2 181	NDA	NDA
<i>P. aeruginosa</i> 2 296	NDA	NDA
<i>A. baumannii</i> 21	≥ 125 µg / ml	≥ 250 µg / ml
<i>A. baumannii</i> 56	NDA	NDA

SVEB: *Sargassum vulgare* etanólico bruto, ULEB: *Ulva lactuca* etanólico bruto, CIM: concentração inibitória mínima, NDA: Não ocorreu inibição.

Após triagem mais alguns testes foram realizados, os resultados semelhantes foram unidos e exibidos nas figuras a seguir, nos quais foi possível observar os níveis de inibição e quão significativa foi a ação dos extratos para cada cepa.

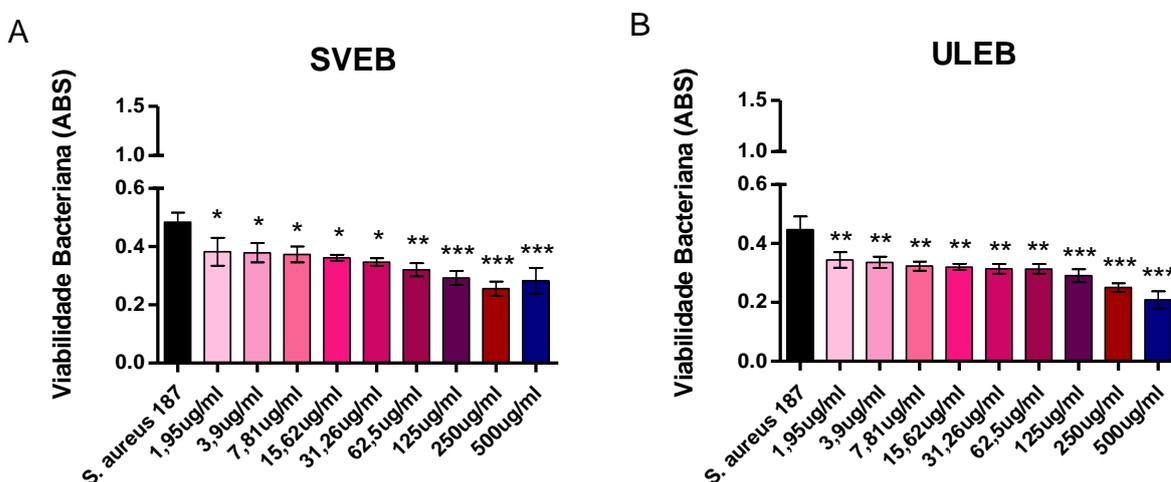
De acordo com os gráficos das figuras 5 e 6, ambas as cepas de *Staphylococcus aureus*, demonstraram sensibilidade quando tratadas com os extratos SVEB e ULEB, apresentando inibição desde a menor concentração. No entanto para *S. aureus* 146 a inibição foi muito discreta, se mostrando significativa apenas quando tratada com as três maiores concentrações de SVEB, diferente de *S. aureus* 187, que apresentou inibição significativa desde a menor concentração para ambos os extratos. O mesmo padrão foi observado nos gráficos da figura 7, no qual a cepa de *S. mutans* 06 exibiu sensibilidade significativa nos dois extratos testados desde a menor concentração. Já *S. sanguinis* 15300 obteve melhor resposta ao tratamento com SVEB (A), apresentando sensibilidade significativa desde a menor concentração, quando tratada com ULEB (B) apresentou inibição significativa apenas na maior concentração como pode ser observado na figura 8.

Figura 5 - Avaliação da atividade dos extratos *Sargassum vulgare* e *Ulva lactuca* frente à *Staphylococcus aureus* 146.



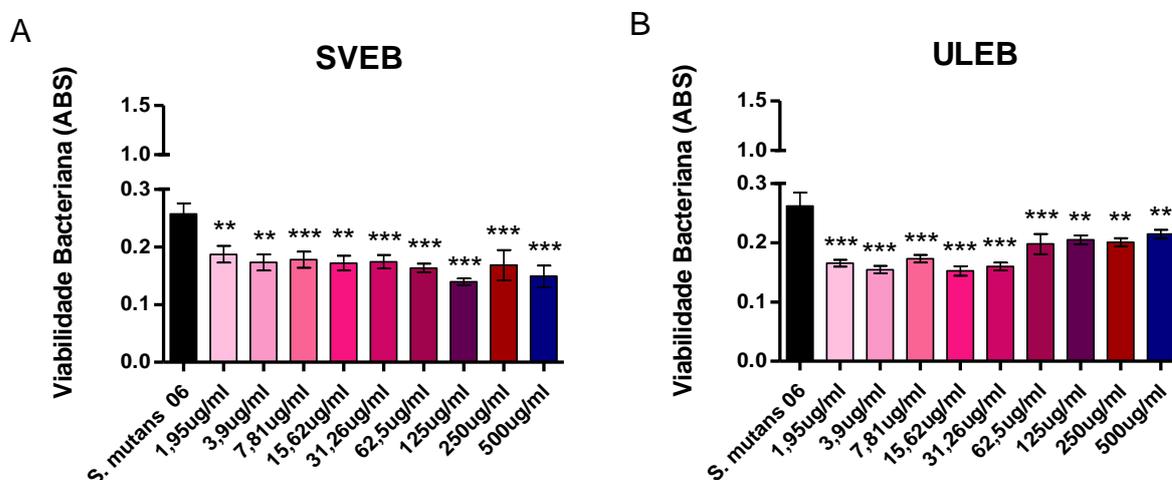
(A) Apresenta a média e o erro padrão do ensaio de Teste de Sensibilidade a Agentes Antimicrobianos. Os dados foram analisados pelo teste Newman-Keuls, ($p < 0,05$). SVEB: *Sargassum vulgare* extrato etanólico bruto; *S. aureus* 146: microrganismo sem tratamento (controle proliferativo); *: $P < 0,05$ em relação a *S. aureus* 146. (B) Gráfico apresenta a média e o erro padrão do ensaio de Teste de Sensibilidade a Agentes Antimicrobianos. Os dados foram analisados pelo teste Newman-Keuls, ($p < 0,05$). ULEB: *Ulva lactuca* extrato etanólico bruto; *S. aureus* 146: microrganismo sem tratamento (controle proliferativo).

Figura 6 - Avaliação da atividade dos extratos *Sargassum vulgare* e *Ulva lactuca* frente à *Staphylococcus aureus* 187.



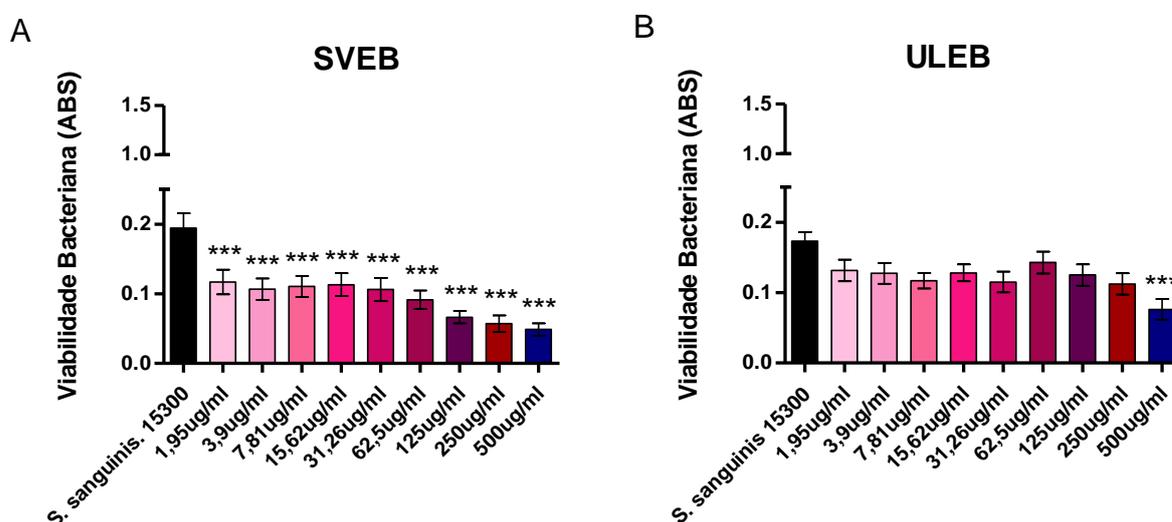
(A) Gráfico apresenta a média e o erro padrão do ensaio de Teste de Sensibilidade a Agentes Antimicrobianos. Os dados foram analisados pelo teste Newman-Keuls, ($p < 0,05$). SVEB: *Sargassum vulgare* extrato etanólico bruto; *S. aureus* 187: microrganismo sem tratamento (controle proliferativo); ***: $P < 0,001$; **: $P < 0,01$; *: $P < 0,05$ em relação a *S. aureus* 187. (B) Gráfico apresenta a média e o erro padrão do ensaio de Teste de Sensibilidade a Agentes Antimicrobianos. Os dados foram analisados pelo teste Newman-Keuls, ($p < 0,05$). ULEB: *Ulva lactuca* extrato etanólico bruto; *S. aureus* 187: microrganismo sem tratamento (controle proliferativo); ***: $P < 0,001$; **: $P < 0,01$ em relação a *S. aureus* 187.

Figura 7 - Avaliação da atividade dos extratos *Sargassum vulgare* e *Ulva lactuca* frente à *Streptococcus mutans* 06.



(A) Gráfico apresenta a média e o erro padrão do ensaio de Teste de Sensibilidade a Agentes Antimicrobianos. Os dados foram analisados pelo teste Newman-Keuls, ($p < 0,05$). SVEB: *Sargassum vulgare* extrato etanólico bruto; *S. mutans* 06: microrganismo sem tratamento (controle proliferativo); ***: $P < 0,001$; **: $P < 0,01$ em relação a *S. mutans* 06. (B) Gráfico apresenta a média e o erro padrão do ensaio de Teste de Sensibilidade a Agentes Antimicrobianos. Os dados foram analisados pelo teste Newman-Keuls, ($p < 0,05$). ULEB: *Ulva lactuca* extrato etanólico bruto; *S. mutans* 06: microrganismo sem tratamento (controle proliferativo); ***: $P < 0,001$; **: $P < 0,01$ em relação a *S. mutans* 06.

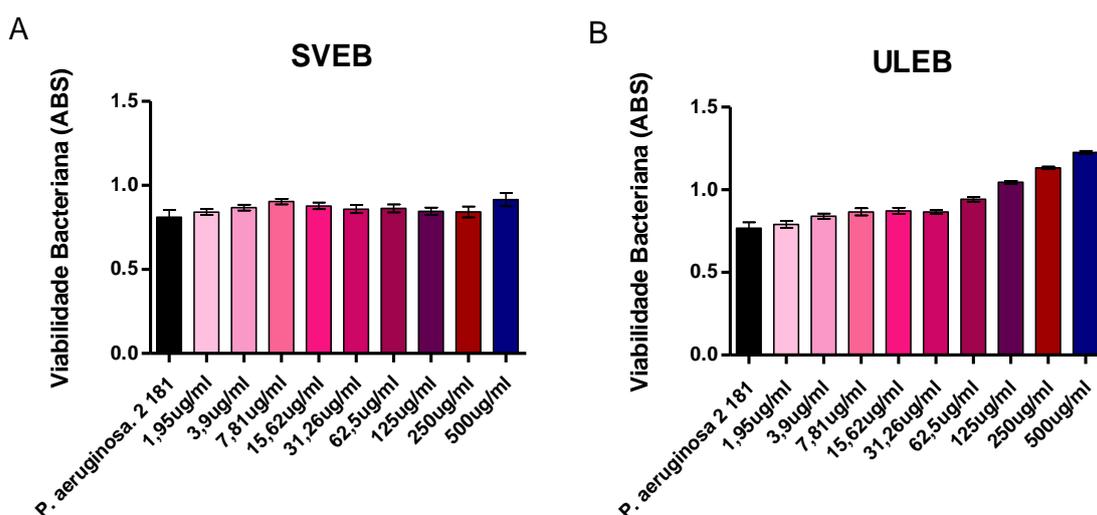
Figura 8 - Avaliação da atividade dos extratos *Sargassum vulgare* e *Ulva lactuca* frente à *Streptococcus sanguinis* 15300.



(A) Gráfico apresenta a média e o erro padrão do ensaio de Teste de Sensibilidade a Agentes Antimicrobianos. Os dados foram analisados pelo teste Newman-Keuls, ($p < 0,05$). SVEB: *Sargassum vulgare* extrato etanólico bruto; *S. sanguinis* 15300: microrganismo sem tratamento (controle proliferativo); ***: $P < 0,001$ em relação a *S. sanguinis* 15300. (B) Gráfico apresenta a média e o erro padrão do ensaio de Teste de Sensibilidade a Agentes Antimicrobianos. Os dados foram analisados pelo teste Newman-Keuls, ($p < 0,05$). ULEB: *Ulva lactuca* extrato etanólico bruto; *S. sanguinis* 15300: microrganismo sem tratamento (controle proliferativo); ***: $P < 0,001$ em relação a *S. sanguinis* 15300.

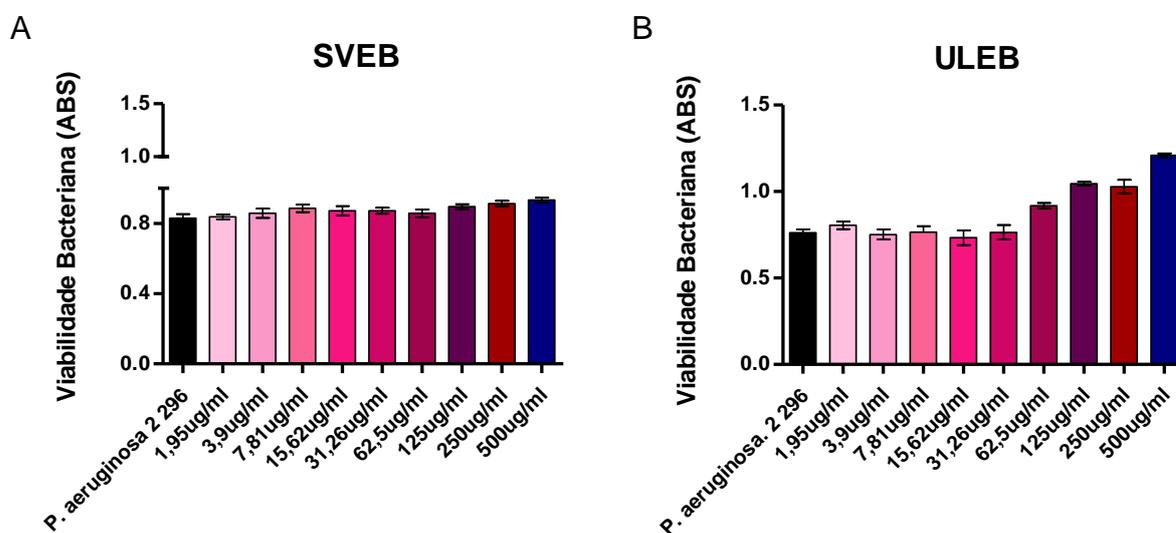
Como demonstrado nos gráficos das figuras 9 a 14, pode-se confirmar a menor sensibilidade nas cepas gram-negativas. Das quatro cepas de *Pseudomonas aeruginosa* testadas, só uma demonstrou inibição significativa leve em apenas uma concentração. *P. aeruginosa* 2 181 (não apresentou nenhum grau de inibição, quando tratada com os dois extratos. *P. aeruginosa* 2 296 não apresentou sensibilidade ao extrato SVEB, no entanto quando tratado com o extrato ULEB apresentou uma leve inibição na concentração de 15,62 µg/mL que por ser muito discreta, não se mostrou significativa. *P. aeruginosa* 01 apresentou uma leve inibição nas menores concentrações, que foi desaparecendo conforme as concentrações foram aumentando, o mesmo padrão foi observado quando tratado com ambos os extratos. Já *P. aeruginosa* 03 quando tratada com SVEB demonstrou uma inibição significativa na concentração de 15,62 µg/mL. Quando tratada com ULEB também exibiu uma leve inibição nas menores concentrações, que desapareceram conforme as concentrações aumentaram. De acordo com os gráficos da figura 11, podemos observar que *A. baumannii* 21 ao contrário da maioria das cepas gram-negativas apresentou sensibilidade aos extratos, mesmo que apenas nas três maiores concentrações, entretanto só quando tratada com ULEB esta inibição foi estatisticamente significativa. A cepa *A. baumannii* 56 por sua vez não demonstrou qualquer sensibilidade quando tratada com os dois extratos.

Figura 9 - Avaliação da atividade dos extratos *Sargassum vulgare* e *Ulva lactuca* frente à *Pseudomonas aeruginosa* 2 181.



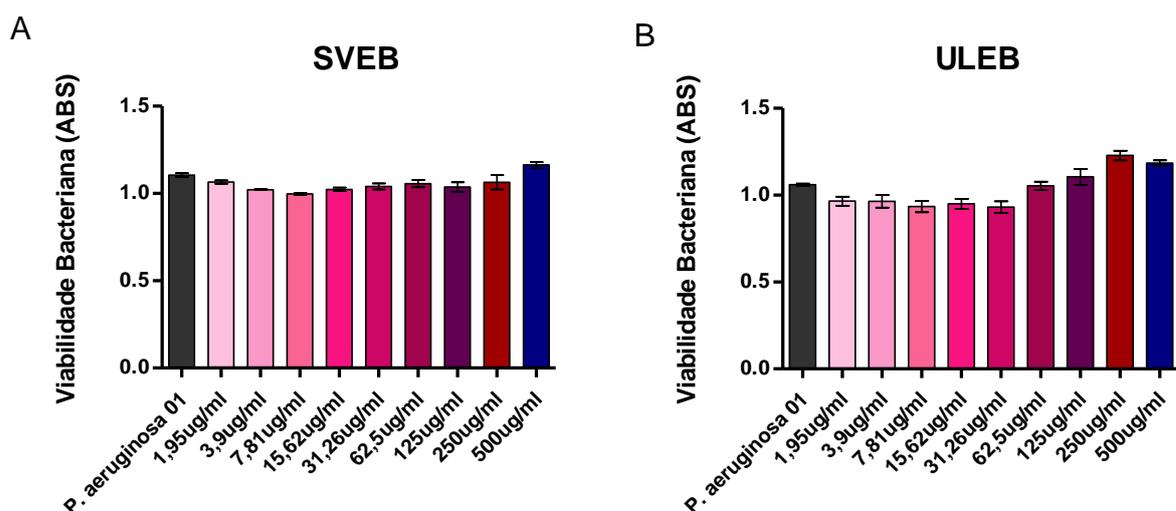
(A) Gráfico apresenta a média e o erro padrão do ensaio de Teste de Sensibilidade a Agentes Antimicrobianos. Os dados foram analisados pelo teste Newman-Keuls, ($p < 0,05$). SVEB: *Sargassum vulgare* extrato etanólico bruto; *P. aeruginosa* 2 181: microrganismo sem tratamento (controle proliferativo). (B) Gráfico apresenta a média e o erro padrão do ensaio de Teste de Sensibilidade a Agentes Antimicrobianos. Os dados foram analisados pelo teste Newman-Keuls, ($p < 0,05$). ULEB: *Ulva lactuca* extrato etanólico bruto; *P. aeruginosa* 2 181: microrganismo sem tratamento (controle proliferativo).

Figura 10 - Avaliação da atividade dos extratos *Sargassum vulgare* e *Ulva lactuca* frente à *Pseudomonas aeruginosa* 2 296.



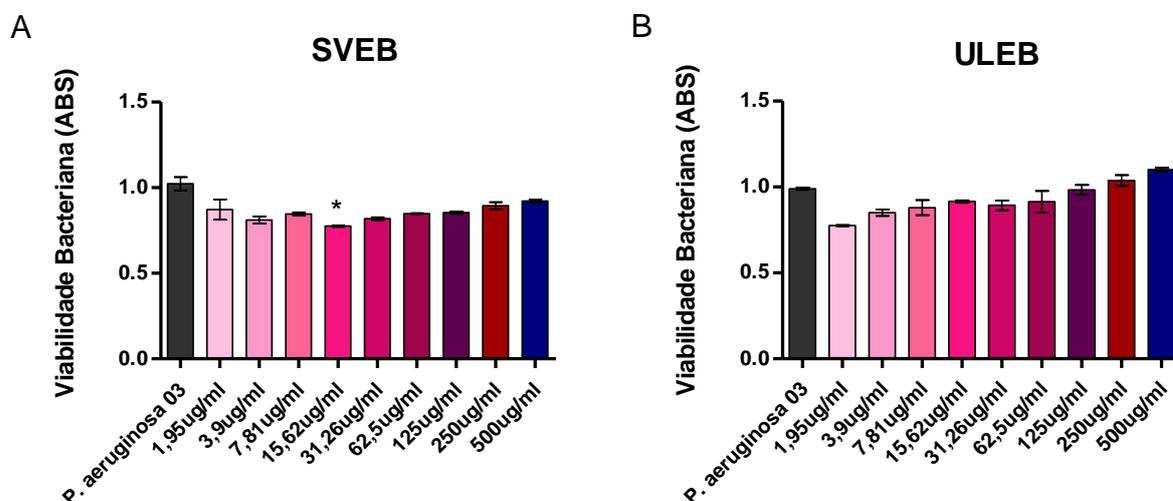
(A) Gráfico apresenta a média e o erro padrão do ensaio de Teste de Sensibilidade a Agentes Antimicrobianos. Os dados foram analisados pelo teste Newman- Keuls, ($p < 0,05$). SVEB: *Sargassum vulgare* extrato etanólico bruto; *P. aeruginosa* 2 296: microrganismo sem tratamento (controle proliferativo). (B) Gráfico apresenta a média e o erro padrão do ensaio de Teste de Sensibilidade a Agentes Antimicrobianos. Os dados foram analisados pelo teste Newman- Keuls, ($p < 0,05$). ULEB: *Ulva lactuca* extrato etanólico bruto; *P. aeruginosa* 2 296: microrganismo sem tratamento (controle proliferativo).

Figura 11 - Avaliação da atividade dos extratos *Sargassum vulgare* e *Ulva lactuca* frente à *Pseudomonas aeruginosa* 01.



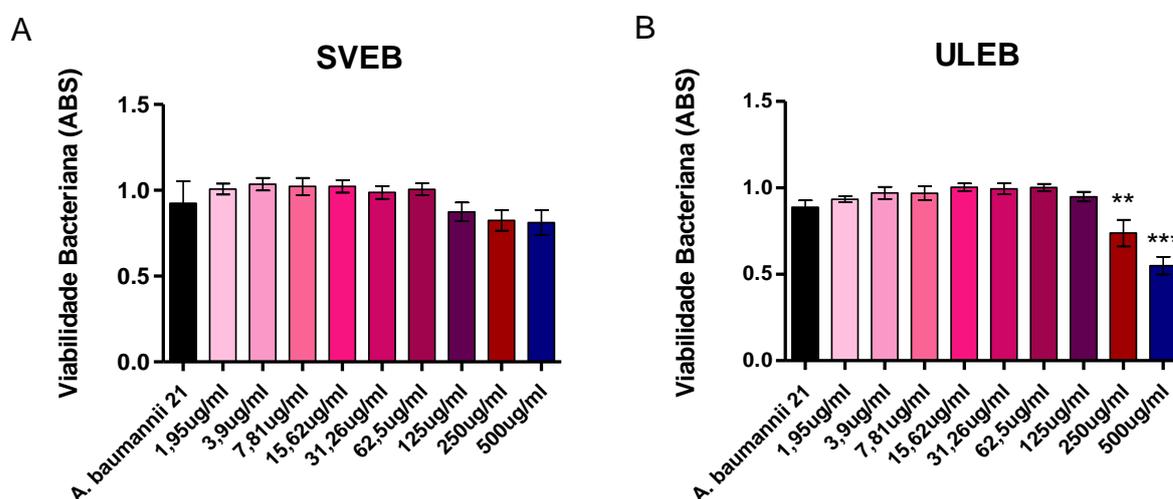
(A) Gráfico apresenta a média e o erro padrão do ensaio de Teste de Sensibilidade a Agentes Antimicrobianos. Os dados foram analisados pelo teste Newman- Keuls, ($p < 0,05$). SVEB: *Sargassum vulgare* extrato etanólico bruto; *P. aeruginosa* 01: microrganismo sem tratamento (controle proliferativo). (B) Gráfico apresenta a média e o erro padrão do ensaio de Teste de Sensibilidade a Agentes Antimicrobianos. Os dados foram analisados pelo teste Newman- Keuls, ($p < 0,05$). ULEB: *Ulva lactuca* extrato etanólico bruto; *P. aeruginosa* 01: microrganismo sem tratamento (controle proliferativo).

Figura 12 - Avaliação da atividade dos extratos *Sargassum vulgare* e *Ulva lactuca* frente a *Pseudomonas aeruginosa* 03.



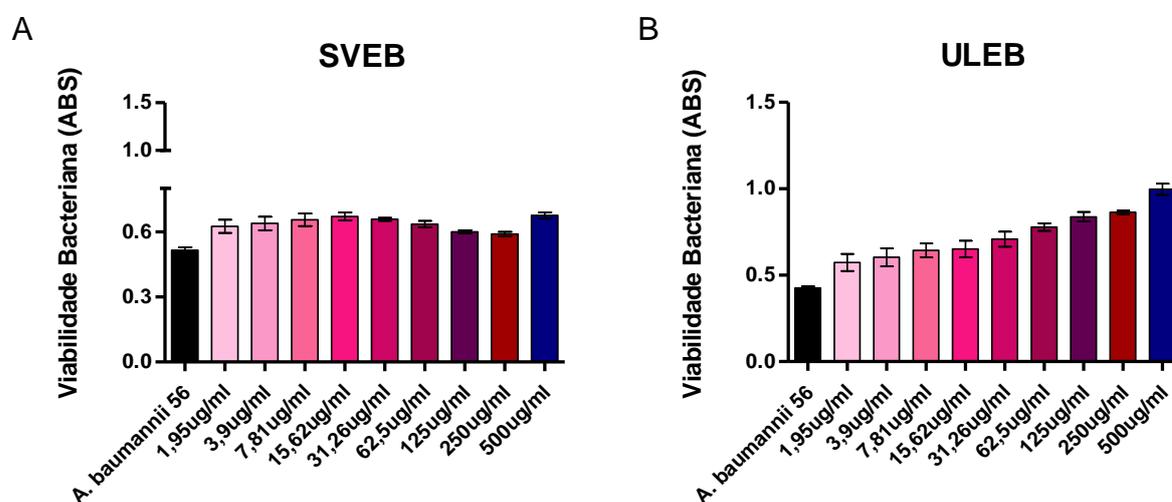
(A) Gráfico apresenta a média e o erro padrão do ensaio de Teste de Sensibilidade a Agentes Antimicrobianos. Os dados foram analisados pelo teste Newman-Keuls, ($p < 0,05$). SVEB: *Sargassum vulgare* extrato etanólico bruto; *P. aeruginosa* 03: microrganismo sem tratamento (controle proliferativo); *: $P < 0,05$ em relação a *P. aeruginosa* 03. (B) Gráfico apresenta a média e o erro padrão do ensaio de Teste de Sensibilidade a Agentes Antimicrobianos. Os dados foram analisados pelo teste Newman-Keuls, ($p < 0,05$). ULEB: *Ulva lactuca* extrato etanólico bruto; *P. aeruginosa* 03: microrganismo sem tratamento (controle proliferativo).

Figura 13 - Avaliação de viabilidade bacteriana frente a *Acinetobacter baumannii* 21.



A) Gráfico apresenta a média e o erro padrão do ensaio de Teste de Sensibilidade a Agentes Antimicrobianos. Os dados foram analisados pelo teste Newman-Keuls, ($p < 0,05$). ULEB: *Ulva lactuca* extrato etanólico bruto; *A. baumannii* 21: microrganismo sem tratamento (controle proliferativo). (B) Gráfico apresenta a média e o erro padrão do ensaio de Teste de Sensibilidade a Agentes Antimicrobianos. Os dados foram analisados pelo teste Newman-Keuls, ($p < 0,05$). ULEB: *Ulva lactuca* extrato etanólico bruto; *A. baumannii* 21: microrganismo sem tratamento (controle proliferativo); ***: $P < 0,001$; **: $P < 0,01$ em relação a *A. baumannii* 21.

Figura 14 - Avaliação da atividade dos extratos *Sargassum vulgare* e *Ulva lactuca* frente à *Acinetobacter baumannii* 21.



(A) Gráfico apresenta a média e o erro padrão do ensaio de Teste de Sensibilidade a Agentes Antimicrobianos. Os dados foram analisados pelo teste Newman-Keuls, ($p < 0,05$). ULEB: *Ulva lactuca* extrato etanólico bruto; *A. baumannii* 56: microrganismo sem tratamento (controle proliferativo). (B) Gráfico apresenta a média e o erro padrão do ensaio de Teste de Sensibilidade a Agentes Antimicrobianos. Os dados foram analisados pelo teste Newman-Keuls, ($p < 0,05$). ULEB: *Ulva lactuca* extrato etanólico bruto; *A. baumannii* 56: microrganismo sem tratamento (controle proliferativo).

Na tabela 4 estão apresentados os percentuais de inibição da viabilidade bacteriana após tratamento com os extratos de *Sargassum vulgare*.

Tabela 4 – Percentual de inibição da viabilidade bacteriana por *Sargassum vulgare*

	Percentual de inibição SVEB								
	1,95 µg/ml	3,9 µg/ml	7,81 µg/ml	15,62 µg/ml	31,26 µg/ml	62,5 µg/ml	125 µg/ml	250 µg/ml	500 µg/ml
<i>S. aureus</i> 146	16,62	8,03	18,28	19,11	22,71	12,74	39,89	45,15	29,64
<i>S. aureus</i> 187	20,87	21,69	22,93	25,21	28,31	33,88	39,67	47,11	41,53
<i>S. mutans</i>	27,24	32,68	30,74	33,07	32,30	36,19	45,91	34,63	42,02
<i>S. sanguinis</i> 15300	40,00	45,13	43,08	42,05	45,64	53,33	66,15	70,77	75,38
<i>P. aeruginosa</i> 2 181	-3,82	-7,03	-11,47	-8,26	-5,92	-6,41	-4,32	-3,82	-12,95
<i>P. aeruginosa</i> 2 296	-1,09	-3,38	-7,00	-5,19	-5,19	-3,38	-7,96	-10,13	-12,67
<i>P. aeruginosa</i> 01	3,62	7,59	9,76	7,41	5,88	4,52	6,15	3,80	-5,15
<i>P. aeruginosa</i> 03	14,75	20,80	17,29	24,32	19,92	17,09	16,60	12,60	9,86
<i>A. baumannii</i> 21	-8,86	-12,00	-10,49	-10,59	-6,81	-8,65	5,41	10,92	12,22
<i>A. baumannii</i> 56	-21,36	-24,08	-27,38	-30,29	-27,77	-23,30	-16,50	-14,56	-31,07

Resultados positivos: porcentagem de inibição da viabilidade bacteriana; Resultados negativos: porcentagem de crescimento da viabilidade bacteriana.

Na tabela 5 estão apresentados os percentuais de inibição da viabilidade bacteriana após tratamento com os extratos de *Ulva lactuca*.

Tabela 5 – Percentual de inibição da viabilidade bacteriana por *Ulva lactuca*

	Percentual de inibição ULEB								
	1,95 µg/ml	3,9 µg/ml	7,81 µg/ml	15,62 µg/ml	31,26 µg/ml	62,5 µg/ml	125 µg/ml	250 µg/ml	500 µg/ml
<i>S. aureus</i> 146	12,25	18,60	19,91	20,13	22,76	23,63	29,32	34,57	36,76
<i>S. aureus</i> 187	23,04	24,83	27,52	28,41	29,75	29,75	35,12	43,85	53,24
<i>S. mutans</i>	37,02	40,84	33,97	41,98	38,93	24,43	21,76	23,28	17,94
<i>S. sanguinis</i> 15300	23,70	26,59	32,37	26,01	33,53	17,34	27,75	35,26	56,07
<i>P. aeruginosa</i> 2 181	-3,00	-9,52	-12,91	-13,82	-13,04	-22,82	-36,38	-47,72	-59,84
<i>P. aeruginosa</i> 2 296	-5,65	1,18	-0,66	3,68	-0,39	-20,76	-37,32	-35,22	-58,87
<i>P. aeruginosa</i> 01	8,87	8,96	11,79	10,38	12,08	0,47	-4,25	-15,94	-11,89
<i>P. aeruginosa</i> 03	21,62	14,14	11,11	7,47	9,70	7,58	0,71	-4,85	-11,31
<i>A. baumannii</i> 21	-5,29	-9,35	-9,12	-13,06	-12,16	-12,95	-6,87	16,89	38,18
<i>A. baumannii</i> 56	-34,82	-42,35	-51,29	-53,18	-66,59	-83,29	-97,18	-96,71	-134,59

Resultados positivos: porcentagem de inibição da viabilidade bacteriana; Resultados negativos: porcentagem de crescimento da viabilidade bacteriana.

6. DISCUSSÃO

Como mencionado anteriormente, faz-se necessário encontrar novas moléculas que possam ser utilizadas ou que sirvam de modelo para o desenvolvimento de fármacos antimicrobianos. Segundo Boopathy (2010), o oceano contém um grande número de produtos naturais e novos componentes químicos com atividades biológicas. Além disso, estudos realizados em várias espécies de algas têm destacado seu potencial terapêutico (IBTISSAM *et al.*, 2009), incluindo espécies de *Sargassum*, que já demonstrou ter efeito antiviral (PLOUGUERNE *et al.*, 2013), anti-inflamatório (SARASWATI *et al.*, 2019), antiangiogênico, antitumoral (DORE *et al.*, 2013), anticoagulante, antitrombótico e antioxidante (DORE *et al.*, 2013). Da mesma forma, a literatura relata atividades múltiplas para os compostos derivados das espécies de *Ulva*, como antitumoral, antioxidante (SHAO *et al.*, 2013), anticoagulante (MAO *et al.*, 2006), antiviral (CHIU *et al.*, 2012), anti-inflamatório (MARGRET *et al.*, 2009) e antibacteriana (ANJALI *et al.*, 2019).

Apesar de não ter realizado estudo de bioprospecção, trabalhos já publicados relatam alguns compostos encontrados em algas com potencial para o tratamento de várias enfermidades, como os meroterpenoides, que correspondem a quase metade dos compostos encontrados no gênero *Sargassum*, entre eles, as plastoquinonas, cromenois e cromenos, que já mostraram possuir propriedades antioxidantes e antitumoral (LIU *et al.*, 2012), hipoglicemiante (KIM *et al.*, 2017) antioxidante e antiviral (IWASHIMA *et al.*, 2005). Esses meroterpenoides ainda são capazes de tratar doenças de pele, úlceras gástricas e doença vascular cerebral (ALI *et al.*, 2012 *apud* MORI *et al.*, 2006; HUR *et al.*, 2008; PARK *et al.*, 2008). Outros exemplos são os florotaninos, que, em estudo realizado por Wei (2008), mostrou ter potencial anticoagulante e antioxidante.

Os polissacarídeos também merecem destaque, os de algas se mostram diferenciados por serem sulfatados, o que lhes confere propriedades diferenciadas e benéficas à saúde (PESO-ECHARRI *et al.*, 2012), como os fucoidanos, que é característico das algas pardas e já mostrou ter atividade antiviral, antitumoral, anti-inflamatória, antioxidante, antimicrobiano (LIU *et al.*, 2012). Ademais, os alginatos que quando consumidos na alimentação se mostraram eficazes na redução do colesterol e glicose do sangue, como também na redução da pressão arterial, estimulante da resposta imune, efeito preventivo contra o câncer, reparador da mucosa intestinal (PESO-ECHARRI *et al.*, 2012 *apud* HOEBLER *et al.*, 2000; VAUGELADE *et al.*, 2000; BROWNLEE *et al.*, 2005; WARRAND, 2006).

Segundo a literatura, a composição fitoquímica de *Ulva lactuca* inclui alcaloides, terpenos, saponinas, quinina, flavonoides, polissacarídeos, entre outros (ANJALI *et al.*, 2019). Deste último, destaca-se o ulvano, um heteropolissacarídeo sulfatado que, vem despertando interesse na comunidade científica por apresentar propriedades anticoagulante, anti-carcinogênica, anti-proliferativa, antiviral, antioxidante, anti-hipertensiva, anti-inflamatória, dentre outras. Em sua composição, são encontrados ramnose, ácido glucurônico, xilose, ácido idurônico e glicose, o que pode conferir tais propriedades (COLLEN, 2011; KARNJANAPRATUM, 2011; EL BAKY, 2009; KAEFFER, 1999).

Em nossos testes, encontramos diferentes repostas ao tratamento com o extrato etanólico bruto de *Sargassum vulgare* e *Ulva lactuca*. De forma geral, nossos dados coincidem com as pesquisas de Ríos e Recio (2005), em que as cepas gram-positivas demonstraram maior sensibilidade aos extratos do que as cepas gram-negativas (como visto na tabela 1). Com o *Staphylococcus aureus* 146 e 187, foi obtido efeito inibitório desde a menor concentração, entretanto o percentual de inibição foi maior nas três maiores concentrações, chegando a 53,24% na concentração de 500 µg/mL para *Staphylococcus aureus* 187 tratada com *Ulva lactuca*, o que, de acordo com Ríos e Recio (2005) se faz um importante achado. Já *Streptococcus mutans* 06 e *Streptococcus sanguinis* 15300 apresentaram inibição significativa em todas as concentrações, chegando a 75,38% na maior concentração (500 µg/mL) para *S. sanguinis* 15300 tratada com *Sargassum vulgare*. Entretanto, houve uma oscilação no percentual de inibição entre as concentrações.

O mesmo parece acontecer com as cepas gram-negativas, pois quando *Pseudomonas aeruginosa* 01 foi tratada com o extrato de *Sargassum vulgare* e *Ulva lactuca* e quando *Pseudomonas aeruginosa* 03 foi tratada com o extrato de *Ulva lactuca*, ambas apresentam uma leve inibição nas menores concentrações, no entanto esta inibição foi diminuindo conforme as concentrações do extrato foram crescendo. Algumas das cepas gram-negativas testadas não só não apresentaram inibição significativa, como houve um aumento da viabilidade bacteriana conforme as concentrações cresciam. Foram os casos de *Pseudomonas* 2 181, *Pseudomonas* 2 296 e *Acinetobacter* 56 (como demonstrado nas tabelas 4 e 5). *Acinetobacter* 21 se mostrou uma exceção, pois apresentou uma inibição significativa quando tratada com o extrato de *Ulva lactuca* nas maiores concentrações. *Pseudomonas* 03, tratada com o extrato de *Sargassum vulgare*, também demonstrou leve inibição que oscilou entre as concentrações, sendo significativa apenas na concentração 15,62 µg/mL.

Tais achados podem ser atribuídos ao fato de os extratos utilizados nos testes serem brutos, uma vez que a quantidade de moléculas bioativas é grande, nesses casos os compostos

podem se sobrepor. Assim, uma substância pode assumir uma atividade antagonista em relação a outra, sendo necessária a realização de estudos de prospecção fitoquímica, pois, de acordo com Ríos e Recio (2005), o conhecimento da atividade antimicrobiana do extrato é o primeiro passo que deve ser seguido do isolamento dos princípios ativos, da compreensão do mecanismo de ação e, posteriormente, da sua toxicidade contra células humanas e, por fim, observar a interação com antibióticos já utilizados na terapêutica, pois muitos compostos que parecem possuir baixa ação podem potencializar o efeito e até reduzir a quantidade de antibiótico necessária quando usados em associação (SHIBATA *et al.*, 2005).

De acordo com nossos dados, cepas gram-negativas se mostraram pouco susceptíveis à ação de *Sargassum vulgare* e *Ulva lactuca*. Os diferentes perfis de sensibilidade podem estar vinculados com as diferenças na composição das suas paredes celulares. As paredes celulares de bactérias gram-positivas são feitas de peptidoglicanos e dos ácidos teicóicos, enquanto que as paredes celulares de bactérias gram-negativas são feitas de peptidoglicanos, lipopolissacáridos e lipoproteínas (KOSANIĆ *et al.*, 2012; HEIJENOORT, 2001). A porção lipídica da membrana exterior de bactérias gram-negativas é pouco permeável aos antimicrobianos, portanto, a razão para a sua maior resistência. Estudos relatam que a estrutura e permeabilidade da parede celular são razões de diferentes sensibilidades em bactérias gram-positivas, bactérias gram-negativas e fungos (ALBOUCHI *et al.*, 2013; KOSANIĆ *et al.*, 2012). No entanto, Anjali (2019) encontrou em seus resultados excelente efeito inibitório de *Ulva lactuca* contra três diferentes bactérias gram-negativas.

Essa discrepância pode ser atribuída a diversos fatores. Em primeiro lugar, à diferença geográfica da coleta da alga (DEVEAU *et al.*, 2016 *apud* ROBLES *et al.*, 1996). Outro ponto importante a ser levado em conta é que a composição bioquímica das macroalgas está diretamente relacionada às interações que estas têm com os fatores biótico e abiótico (BLACK, 1950; LAMARE; WING, 2001). Nos testes realizados por Deveau (2017), a fase lunar foi fator determinante para o nível de ação inibitória do extrato, chegando em uma determinada fase lunar a níveis de inibição maiores que um antibiótico comercial. Dessa forma, as variáveis, como estação do ano e condições de crescimento, influenciam diretamente no potencial farmacológico da alga, principalmente tratando-se de *Ulva lactuca*, que mostrou ser capaz de sofrer mudanças para adaptar-se às condições ambientais.

Nossos resultados apontam para uma atividade antimicrobiana das espécies de algas testadas. A intensidade do efeito inibitório foi dependente da espécie de alga, da concentração do extrato e do microrganismo testado. Entretanto, pode-se observar maior sensibilidade em

S. mutans, *S. sanguinis* e *S. aureus*, todas bactérias gram-positivas, enquanto que as bactérias gram-negativas *P. aeruginosa* e *A. baumannii* não apresentaram sensibilidade ou apresentaram de forma moderada. Esses resultados corroboram com Ghania e colaboradores (2017), que demonstrou a ação antibacteriana de *Sargassum vulgare* frente a cepas gram-positivas, incluindo *Staphylococcus aureus*, enquanto que em cepas gram-negativas, dentre elas *Pseudomonas aeruginosa*, não foi possível notar qualquer efeito. Da mesma forma, *Ulva lactuca* demonstrou ser um promissor agente contra infecções estafilocócicas, esses achados são semelhantes aos relatados por Deveau e colaboradores (2016).

Considerando os níveis de patogencidade de *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus spp.* nossos resultados se tornam ainda mais relevantes, pois apesar destas bactérias fazerem parte da microbiota natural do corpo humano, também são causadoras de diversas patologias. *Streptococcus spp.* comumente estão envolvidas em infecções orais, entretanto, as patologias odontológicas podem ser porta de entrada para microrganismos na corrente sanguínea, propiciando o aparecimento de infecções subclínicas, como a endocardite bacteriana (PEGADO, 2010). Enquanto que *Staphylococcus aureus* é capaz de provocar doenças que podem ir desde uma infecção simples (espinha, furúnculos e celulites) até infecções graves (bacteremia, pneumonia, osteomielite, endocardite, miocardite, pericardite, meningite, abscessos musculares e cerebrais) (PFALLER, 2014; GELATTI et al, 2009). Tais fatores demonstram a relevância do estudo destas espécies bacterianas.

7. CONCLUSÃO

Após a avaliação microbiológica realizada com os extratos das algas *Sargassum vulgare* e *Ulva lactuca* pode-se concluir que:

- As cepas Gram positivas têm maior susceptibilidade aos extratos de algas testados;
- A menor concentração testada (1,95 µg / ml), foi definida como a CIM para os dois extratos, chegando a reduzir a viabilidade bacteriana em 40% para *Streptococcus sanguinis* 15300 tratada com SVEB e 37,02% para *Streptococcus mutans* tratada SVEB;
- *Streptococcus sanguinis* 15300 é a cepa mais sensível, chegando aos percentuais de inibição de: 75,38% e 56,07%, quando tratada com 500 µg / ml de *Sargassum vulgare* e *Ulva lactuca* respectivamente.
- *Staphylococcus aureus* 187 é a segunda cepa mais sensível, alcançando níveis de inibição de 47, 11% para *Sargassum vulgare* e 53,24% para *Ulva lactuca*, quando tratada com as concentrações de 250 µg / ml e 500 µg / ml respectivamente.

Os dados apresentados nos permite sugerir que os extratos utilizados possuem substâncias bioativas, que expressam atividade antimicrobiana. Sendo necessários outros ensaios para caracterização de tais substâncias e a elucidação de suas vias de ação.

8. REFERÊNCIAS

- ALI, M.Y. (*et al*). α -Glucosidase and Protein Tyrosine Phosphatase 1B Inhibitory Activity of Plastoquinones from Marine Brown Alga *Sargassum serratifolium*. **Marine Drugs**. v. 12; n. 368, 2017.
- ANJALI, K.P. (*et al*). Bioprospecting of seaweeds (*Ulva lactuca* and *Stoechospermum marginatum*): The compound characterization and functional applications in medicine-a comparative study. **J Photochem Photobiol B**. v. 200; n. 111622, 2019.
- BARREIRO, E. J.; BOLZANI, V.S. Biodiversidade: fonte potencial para a descoberta de fármacos. **Química Nova** [online]. 2009, v. 32, n.3. E-pub 22 Maio 2009. ISSN 1678-7064. Disponível em: <<https://doi.org/10.1590/S0100-40422009000300012>>. Acesso em 13 de outubro de 2021.
- BHATNAGAR, I.; KIM, S. K.; Marine antitumor drugs: Status, shortfalls and strategies. **Marine Drugs**. v. 8, p. 2702-2720, 2010.
- BONANNO, G.; VENEZIANO, V.; PICCIONE, V. The alga *Ulva lactuca* (Ulvaceae, Chlorophyta) as a bioindicator of trace element contamination along the coast of Sicily, Italy. **Sci Total Environ**. 2020.
- BRASIL, Ministério da Saúde. **Política nacional de plantas medicinais e fitoterápicos**, Brasília. Ministério da Saúde, 2006. Disponível em: <https://bvsmis.saude.gov.br/bvs/publicacoes/politica_nacional_fitoterapicos.pdf>. Acesso em: 01 de dezembro de 2021.
- CASSINI, A. (*et al*). Attributable deaths and disability-adjusted life-years caused by infections with antibiotic-resistant bacteria in the EU and the European Economic Area in 2015: a population-level modelling analysis. **Lancet Infect Dis**. v.19; n. 1; p. 56-66, 2019.
- CAVALCANTE, Rogério. As plantas na odontologia: um guia prático. 3.ed. Rio Branco. 2019. Disponível em: <<https://books.google.com.br/books?id=8UKkDwAAQBAJ&pg=PA12&dq=uso+de+planta#v=onepage&q=uso%20de%20planta&f=false>>. Acesso em: 13 de outubro de 2021.
- CHIU, Y.H.; *et al*. Inhibition of Japanese encephalitis virus infection by the sulfated polysaccharide extracts from *Ulva lactuca*. **Mar Biotechnol**. v. 14; n. 4; p. 468-78, 2012.
- CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute). **Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically: approved standard**. 8 ed. 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087- 1898 USA, 2009. (CLSI document M7-A8).
- COGEN, A.; NIZET, V.; GALLO, R., Skin microbiota: a source of disease or defence?. **British Journal of Dermatology**. v.158; p. 442-455, 2008.
- COIMBRA, C. 2006. Inferências filogenéticas na ordem Fucales (Phaeophyceae), com ênfase no gênero *Sargassum* C. Agardh do Atlântico Sul. **Tese** (Doutorado), Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo. Departamento de Botânica, São Paulo.

COSTA-LOTUFO, L. (*et al.*). Organismos marinhos como fonte de novos fármacos: Histórico & perspectivas. **Química Nova**, 2009.

DEVEAU, A.M. (*et al.*). Antimicrobial activity of extracts from macroalgae *Ulva lactuca* against clinically important Staphylococci is impacted by lunar phase of macroalgae harvest. **Lett Appl Microbiol.** v. 62; n. 5; p. 363-71, 2016.

DOMINGUEZ, H.; LORET, E.P. *Ulva lactuca*, A Source of Troubles and Potential Riches. **Mar Drugs.** v. 17; n. 6; p.357, 2019.

DORE, C.M.P.G. (*et al.*). A sulfated polysaccharide, fucans, isolated from brown algae *Sargassum vulgare* with anticoagulant, antithrombotic, antioxidant and anti-inflammatory effects. **Carbohydr Polym.** v. 91; n. 1; p. 467-75, 2013.

FELICIO, R.; OLIVEIRA, A. L. L.; DEBONSI, H. M. Bioprospecção a partir dos oceanos: conectando a descoberta de novos fármacos aos produtos naturais marinhos. **Cienc. Cult.**, v. 64, n. 3, p. 39-42, 2012

FENICAL, W.; JENSEN, P. R. Developing a new resource for drug discovery: marine actinomycete bacteria. **Nature chemical biology.** v. 2; n.12, p. 666-673; 2006.

FRANCO, J. M. P. L. (*et al.*). O papel do farmacêutico frente à resistência bacteriana ocasionada pelo uso irracional de antimicrobianos. **Semana Acadêmica, Fortaleza**, v. 1, n. 72, p.1- 17, 2015.

GELATTI, L. C. (*et al.*) Sepsis por *Staphylococcus aureus* resistente à metilina adquirida na comunidade no sul do Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical** [online]. 2009, v. 42, n. 4. Disponível em: <<https://doi.org/10.1590/S0037-86822009000400019>>. Acesso em: 20 de outubro de 2021.

GIORDANI, Mário Curtis. **História do império bizantino**. 5ª edição, Petropolis – Vozes, 2001. P. 263-285.

GHANIA, A.; (*et al.*). Antimicrobial and antiparasitic activities of three algae from the northwest coast of Algeria. **Nat Prod Res.** v. 33; n. 5; p.742-745, 2019.

GIEDRAITIENĖ, A.; VITKAUSKIENĖ, A.; NAGINIENĖ, R.; PAVILONIS, A. Antibiotic Resistance Mechanisms of Clinically Important Bacteria. **Medicina** 2011, v. 47; n. 19.

GUEDES, Élica Amara Cecília. Bioprospecção de extratos de macroalgas marinhas bentônicas do litoral de Alagoas. 2020. 75 f. **Tese** (Doutorado em Rede Nordeste de Biotecnologia) - Instituto de Química e Biotecnologia, Programa de Pós-Graduação da Rede Nordeste de Biotecnologia (RENORBIO), Universidade Federal de Alagoas, Maceió, 2011.

GURIB-FAKIM, A. Medicinal plants: traditions of yesterday and drugs of tomorrow. **Mol Aspects Med.** v. 27; n. 1, p. 1-93, 2006.

HOEK, C.; MANN, D.; JAHNS, H. Algae. An Introduction to Phycology. 10.2307/1468159. Cambridge University Press, Cambridge, 1995.

HO, Y. *Ulva lactuca* as bioindicator of metal contamination in intertidal waters in Hong Kong. **Hydrobiologia.** v. 203, p. 73–81, 1990.

HOU, J.P. The development of Chinese herbal medicine and the Pen-ts'ao. **Comp Med East West**. v. 5; n. 2; p. 117-22, 1977.

IVANOVA, V. (*et al*). Isolation of a polysaccharide with antiviral effect from *Ulva lactuca*. **Prep Biochem**. v. 24; n. 2; p. 83-97, 1994.

IWASHIMA, M. M. J. (*et al*). Antioxidant and antiviral activities of plastoquinones from the brown alga *Sargassum micracanthum*, and a new chromene derivative converted from the plastoquinones. **Biol Pharm Bull**. v. 28; n. 2; p. 374-7, 2005.

KAEFFER, B. (*et al*). Biological properties of ulvan, a new source of green seaweed sulfated polysaccharides, on cultured normal and cancerous colonic epithelial cells. **Planta Med**. v. 65; n. 6; p. 527-31, 1999.

KARNJANAPRATUM, S.; YOU, S. Molecular characteristics of sulfated polysaccharides from *Monostroma nitidum* and their in vitro anticancer and immunomodulatory activities. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 48; n. 2, p. 311–318, 2011.

LARTIGUE, J. (*et al*). The impact of salinity fluctuations on net oxygen production and inorganic nitrogen uptake by *Ulva lactuca* (Chlorophyceae). **Aquatic Botany**, v. 75; n. 4; p. 339–350, 2003.

LITTLER, M. M., Morphological form and photosynthetic performances of marine macroalgae: test of a functional form hypothesis, **Bot**. v. 22; p. 161–165, 1980.

LIBERATO, M. C. **O saber português dos trópicos na evolução do conhecimento das plantas medicinais**. Instituto de Investigação Científica tropical, 2008. Disponível em: <<https://silo.tips/download/o-saber-portugues-dos-tropicos-na-evoluao-do-conhecimento-das-plantas-medicinais#embed>>. Acesso em: 20 out 2021.

LIU, L. (*et al*). Towards a better understanding of medicinal uses of the brown seaweed *Sargassum* in Traditional Chinese Medicine: a phytochemical and pharmacological review. **J Ethnopharmacol**. v. 142; n. 3; p. 591-619, 2012.

MALACRIDA, A. M.; DIAS, V. H. C.; DE LIMA, C. L. Perfil epidemiológico das doenças bacterianas transmitidas por alimentos no Brasil. **Revista De Ciência Veterinária E Saúde Pública**, 4, 158-162, 2017.

MAO, W. (*et al*). Polissacarídeos sulfatados de algas verdes marinhas *Ulva conglobata* e sua atividade anticoagulante. **J Appl Phycol** v.18; p. 9–14, 2006.

MARGRET, R.J.; KUMARESAN, S.; RAVIKUMAR, S. A preliminary study on the anti-inflammatory activity of methanol extract of *Ulva lactuca* in rat. **J Environ Biol**. v. 30; p. 899-902, 2009.

MD GUIRY EM GUIRY, MD & GUIRY, GM 2021. Alga e Base. Publicação eletrônica mundial, National University of Ireland, Galway. <http://www.algaebase.org>; pesquisado em 25 de agosto de 2021.

MONTEIRO, S.C.; BRANDELLI, C.L.C. Farmacobotânica: Aspectos Teóricos e Aplicação. Porto Alegre – Artmed, 2017

- NEORI, A. (*et al*). Integrated aquaculture: Rationale, evolution and state of the art emphasizing seaweed biofiltration in modern mariculture. **Aquaculture**. v.231; p. 361-391, 2004.
- NEWMAN, D.J.; CRAGG, G.M. Drugs and Drug Candidates from Marine Sources: An Assessment of the Current “state of Play” **Planta Med.** v. 82, n.9-10; 775–89, 2016.
- O’NEILL, J. The Review On Antimicrobial Resistance. AMR, 2016. Disponível em: <https://amr-review.org/sites/default/files/160525_Final%20paper_with%20cover.pdf>. Acesso em: 01 de agosto de 2021.
- PAULA, E. O Gênero *Sargassum* C. Ag. (Phaeophyta - Fucales) no Litoral do Estado de São Paulo, Brasil. **Boletim De Botânica**, v. 10, p. 65-118, 1988.
- PAULA, É. J. de (*et al*). **Introdução à Biologia das Criptógamas**. São Paulo: Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, Departamento de Botânica, P. 89-94, 2007.
- PACHECO, M. R. Macroalgas marinhas associadas a bancos de rodolitos do infralitoral do Espírito Santo, Brasil. 2011. **Tese** (Doutorado em Botânica) - Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.
- PAGAND P. Tratamento de efluentes de peixes marinhos por lagoa de algas de alto rendimento. **Tese de Doutorado**. Montpellier, 1999.
- PEGADO, F. J. N. **Infecções orais por Streptococcus spp. e suas repercussões por via sistêmica: relevância clínica em Medicina Dentária?**. Monografia (Grau de licenciado em Medicina Dentária) – Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade Fernando Pessoa. Porto, p. 26-36. 2010.
- PEREIRA, L. **Guia ilustrado das macroalgas: conhecer e reconhecer algumas espécies da flora portuguesa**. Imprensa da Universidade de Coimbra, Coimbra, 2009.
- PESO-ECHARRI, P. (*et al*). Polissacáridos de algas como ingredientes funcionales en acuicultura marina: alginato, carragenato y ulvano. **Rev. biol. mar. oceanogr.** Valparaíso, v. 47, n. 3, p. 373-381, 2012
- PFALLER, M.R. Microbiologia médica. 7ª ed. Rio de Janeiro: **Elsevier**, 2014. p. 327-328.
- PLOUGUERNÉ, E. (*et al*). Antiviral Sulfoquinovosyldiacylglycerols (SQDGs) from the Brazilian brown seaweed *Sargassum vulgare*. **Mar Drugs**, v. 21, n. 11, p. 4628-40, 2013.
- PUPO, D.; COTO, A.C. S.P. Lista de Ulvophyceae do estado de São Paulo. **Biota Neotropica**. v. 11, p. 137-142, 2011.
- RÍOS, J.L.; RECIO, M.C. Medicinal plants and antimicrobial activity. **J Ethnopharmacol.** 22; v. 100; n. 1-2; p. 80-4, 2005.
- RIVERON, F.F. (*et al*). Resistencia bacteriana. **Rev Cub Med Mil** [online], vol.32, n.1, 2003.
- ROSA, C. A. de P. **História da ciência : da antiguidade ao renascimento científico / Carlos Augusto de Proença**. — 2. ed. — Brasília : FUNAG, 2012.
- SALEHI, B. (*et al*). The Therapeutic Potential of Apigenin. **Int J Mol Sci**, v. 20, n. 6, p. 1.305, 2019.

SANTOS, N.Q. A resistência bacteriana no contexto da infecção hospitalar. **Texto contexto - enferm**, v. 13, p. 64-70, 2004.

SARASWATI; *(et al)*. *Sargassum* Alga marinha como fonte de substâncias anti-inflamatórias e o potencial insight das espécies tropicais: uma revisão. **Mar Drugs**; v. 17; n. 10, 2019.

SHAO, P.; CHEN, X.; SUN, P. In vitro antioxidant and antitumor activities of different sulfated polysaccharides isolated from three algae. **Int J Biol Macromol**. v. 62; p. 155-61, 2013.

SHIBATA, H. *(et al)*. Alkyl gallates, intensifiers of beta-lactam susceptibility in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 49; n. 2, p. 549–555, 2005.

SHIMAA, M.; EL-S.; SAMH S. A.; MOSTAFA M. EL-S. Antimicrobial activity of some seaweeds species from Red sea, against multidrug resistant bacteria, **The Egyptian Journal of Aquatic Research**, v. 42, n. 1; p. 65-74, 2016.

SILVEIRA, G. P. *(et al)*. Estratégias utilizadas no combate a resistência bacteriana. **Quím. Nova**, v. 29, n. 4, p. 844-855, 2006.

SOARES, N.P. *(et al)*. Técnicas de prospecção fitoquímica e sua importância para o estudo de biomoléculas derivadas de plantas. **Enciclopédia Biosfera**. v. 13; p. 991-1010, 2016.

VANDERMEULEN, H., GORDIN, H. Ammonium uptake using *Ulva* (Chlorophyta) in intensive fishpond systems: mass culture and treatment of effluent. **J Appl Phycol** v. 2, p. 363–374, 1990.

VERMAAT, J. E.; SAND-JENSEN, K. Survival, metabolism and growth of *Ulva lactuca* under winter conditions: a laboratory study of bottlenecks in the life cycle. **Marine Biology**, v. 95; n. 1; p. 55–61, 1987.

VIEGAS JR, C.; BOLZANI, V. S.; BARREIRO, E. J. Os produtos naturais e a química medicinal moderna. **Quím. Nova**, v. 29, n. 2, p. 326-337, 2006.

WEKRE, M.E. *(et al)*. Quantificação de Polifenóis em Algas: Um Estudo de Caso de *Ulva intestinalis*. **Antioxidantes (Basiléia)**, v. 8, n. 12, p. 612, 2019.