



Universidade do Algarve
Faculdade de Ciências e Tecnologia

**Avaliação da atividade
antibacteriana de extratos
metanólicos de diferentes espécies
de algas e plantas halófitas.**

Daniela C. Palma

Mestrado Integrado em Engenharia Biológica

(2011)



Universidade do Algarve
Faculdade de Ciências e Tecnologia

**Avaliação da atividade
antibacteriana de extratos
metanólicos de diferentes espécies
de algas e plantas halófitas.**

Daniela C. Palma

Mestrado Integrado em Engenharia Biológica

Orientador:

Professor Doutor João Varela

Co-Orientadoras:

Doutora Luísa Custódio e Professora Doutora Lídia Dionísio

(2011)

Agradecimentos

Ao Prof. João Varela por ter tornado esta tese possível, pela oportunidade que me concedeu, pela orientação dada, apoio e motivação.

À Doutora Luísa Custódio por me ter dado a conhecer o tema, por toda a disponibilidade, ajuda, orientação, apoio e motivação em todas as fases deste trabalho.

À Prof.^a Lídia Dionísio agradeço também a colaboração, orientação e esclarecimentos no decorrer desta dissertação.

À Prof.^a Margarida Reis pela assistência e meios gentilmente cedidos na última fase do trabalho.

Aos meus amigos por todos os bons momentos passados ao longo destes anos, pelo grande apoio e motivação.

A toda a minha família, gostaria de deixar um agradecimento especial por todo o apoio e incentivo ao longo destes anos.

Ao Pedro por todo o seu carinho, pela paciência e apoio nesta fase complicada.

Aos meus pais, a quem dedico esta tese, por terem sempre acreditado em mim e por me terem dado tudo o que podiam.

A todos, muito obrigada!

Glossário

ABS – Absorvância

CMI – Concentração Mínima Inibitória

CLSI – Clinical and Laboratory Standards Institute

°C – Graus centígrados

DO – Densidade ótica

EP – Erro padrão

h – Hora

g, mg – Grama, miligrama

MHA – Mueller-Hinton agar

ml, µl – Mililitro, microlitro

mm, nm – Milímetro, nanómetro

NCTC – National Collection of Type Cultures

PI – Índice de polaridade (do inglês: Polarity Index)

UFC – Unidades formadoras de colónias

Valor p – Nível de significância

Índice de Figuras

Figura 1 - Riscado (a) e coloração Gram (b) de <i>B. cereus</i> . Fonte: http://www.microbelibrary.org	6
Figura 2 - Morfologia (a), riscado (b) e coloração Gram (c) de <i>S. aureus</i> . Fonte: http://www.microbelibrary.org	7
Figura 3 - Riscado (a) e coloração Gram (b) de <i>E. coli</i> . Fonte: http://www.microbelibrary.org	8
Figura 4 - Morfologia da colónia (a), riscado (b) e coloração Gram (c) de <i>P. aeruginosa</i> . Fonte: http://www.microbelibrary.org	8
Figura 5 - Zonas de inibição do extrato metanólico de <i>C. tamariscifolia</i> para o <i>S. aureus</i> . a) Controlo positivo: penicilina G, 10 unidades/disco, b) Controlo negativo: metanol, c) Discos húmidos.....	13
Figura 6 - Zonas de inibição de crescimento de <i>S. aureus</i> na presença do extrato metanólico de (A) <i>C. nodicaulis</i> e (B) <i>C. tamariscifolia</i> (discos secos). a) Controlo positivo: penicilina G, 10 unidades/disco, b) Controlo negativo: metanol, c) Discos secos.....	15

Índice de tabelas

Tabela 1 - Diâmetro das zonas de inibição (mm) observadas para os extratos metanólicos de macro- e microalgas e erva marinha testados. 14

Tabela 2 - Diâmetro das zonas de inibição (mm) observadas para os extratos de plantas halófitas testados. 17

Resumo

Os organismos marinhos são uma fonte fundamental de novos compostos bioativos com potencial interesse para a indústria farmacêutica e com diversas atividades biológicas. Sendo o tratamento de infeções bacterianas cada vez mais dificultado pela capacidade das bactérias de desenvolverem resistência aos agentes antimicrobianos é necessário a contínua descoberta e desenvolvimento de novos compostos antibacterianos para assegurar um futuro sustentável do ponto de vista da saúde pública. Deste modo, este trabalho teve como objetivo avaliar a atividade antibacteriana de extratos de metanol de diferentes espécies de macro- e microalgas, ervas marinhas e plantas halófitas contra estirpes bacterianas potencialmente patogénicas, pelo método de difusão em agar. As diferentes espécies de macroalgas foram colhidas na praia de Olhos d'Água (Albufeira) entre julho e novembro de 2009. As amostras de microalgas foram fornecidas pelo Laboratório Experimental de Organismos Aquáticos (LEOA, UAlg) e pela NECTON S.A. As plantas halófitas foram colhidas em maio de 2010 na Praia de Faro e Ludo. A atividade antibacteriana foi determinada segundo os protocolos padronizados pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute*, através do método de difusão em agar. Foram utilizadas 4 estirpes bacterianas nomeadamente *B. cereus* NCTC 7464, *S. aureus* NCTC 6571 (Gram-positivas), *E. coli* NCTC 9001 e *P. aeruginosa* NCTC 10662 (Gram-negativas). Não foram observadas zonas de inibição nos controlos negativos (metanol) e todos os antibióticos utilizados (ácido nalidíxico, gentamicina, penicilina G e tetraciclina) resultaram em inibição do crescimento bacteriano respetivo. Observaram-se zonas de inibição em *Staphylococcus aureus* na presença dos extratos metanólicos de *Cystoseira nodicaulis* ($8,44 \pm 0,53$ mm) e *C. tamariscifolia* ($11,12 \pm 0,78$ mm). Os restantes extratos metanólicos de algas e ervas marinhas foram inativos em relação às estirpes estudadas. Os extratos de microalgas e de plantas halófitas testados não demonstraram atividade antibacteriana contra as estirpes estudadas. Os resultados obtidos neste trabalho indicam que os extratos de *C. nodicaulis* e *C. tamariscifolia* apresentam atividade antibacteriana. Os restantes extratos não demonstraram, porém, qualquer atividade.

Palavras-chave: Microalgas, macroalgas, ervas marinhas, plantas halófitas, atividade antibacteriana, extratos metanólicos.

Abstract

Marine organisms are a fundamental source of new bioactive compounds with potential interest for the pharmaceutical industry, and exhibit many biological activities. As the treatment of bacterial infections is increasingly hindered by the ability of bacteria to develop resistance to antimicrobial agents it is urgent the discovery and development of new antimicrobial compounds to ensure a sustainable future of public health. Therefore this study aimed to evaluate the antibacterial activity of methanol extracts of different species of macro- and microalgae, seagrasses and halophytes against potentially pathogenic bacterial strains by the agar diffusion method. Macroalgae were collected from Olhos d'Água beach (Albufeira) between July and November (2009). The microalgae samples were provided by Experimental Laboratory of Aquatic Organisms (LEOA, UAlg) and NECTON S.A.. Halophytic species were collected in May 2010 at Faro's beach and Ludo. Antibacterial activity was determined according to the Clinical and Laboratory Standards Institute protocols using an agar diffusion method. The following bacteria strains were used as test organisms: *Bacillus cereus* NCTC 7464, *Staphylococcus aureus* NCTC 6571 (Gram-positive), *Escherichia coli* NCTC 9001 and *Pseudomonas aeruginosa* NCTC 10662 (Gram-negative). In all assays the negative control (methanol) did not show any inhibition of growth and the positive controls (nalidixic acid, gentamicin, penicillin G and tetracycline) always inhibited the growth of the test organisms. Methanol extracts of the macroalgae *Cystoseira nodicaulis* (8,44 ± 0,53 mm) and *C. tamarascifolia* (11,12 ± 0,78 mm) were active against *S. aureus*, and no activity was detected in the tested concentration of the remaining extracts.

Key-Words: Microalgae, macroalgae (seaweeds), seagrasses, halophytes, antibacterial activity, methanolic extracts.

Índice

1. Introdução	1
1.1. Necessidade de novos Antibióticos.....	1
1.2. Diferenças entre Algas e Plantas/Definição	2
1.3. Algas	3
1.4. Macroalgas	3
1.5. Microalgas	4
1.6. Ervas marinhas	4
1.7. Halófitas	5
1.8. Descrição de algumas espécies microbianas com importância a nível clínico..	6
1.8.1. <i>Bacillus cereus</i>	6
1.8.2. <i>Staphylococcus aureus</i>	6
1.8.3. <i>Escherichia coli</i>	7
1.8.4. <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	8
2. Objetivo.....	9
3. Materiais e métodos	10
3.1. Material biológico	10
3.2. Preparação dos extratos metanólicos.....	10
3.3. Estirpes bacterianas	11
3.4. Método de difusão em agar	11

3.5. Apresentação dos dados e Tratamento estatístico.....	12
4. Resultados e Discussão	13
5. Conclusão e Perspetivas futuras	19
6. Bibliografia	20

1. Introdução

Os produtos naturais são uma fonte fundamental de novos compostos bioativos e são componentes integrais do compêndio farmacêutico de hoje (Kumar *et al.*, 2008; Saleem *et al.*, 2010).

O interesse na importância de organismos marinhos como fonte de novos compostos está a crescer. Os organismos marinhos constituem aproximadamente metade do total da biodiversidade na Terra e o ecossistema marinho, com a sua diversidade biológica e química, constitui uma fonte rica de novas terapêuticas (Donia & Hamann, 2003; Kumar *et al.*, 2008; Blunt *et al.*, 2009).

Os organismos marinhos são ricos em metabolitos biologicamente ativos e estruturalmente singulares. Os metabolitos primários ou secundários produzidos por estes organismos podem ser potenciais compostos bioativos de interesse para a indústria farmacêutica (Tuney *et al.*, 2006; Abedin & Taha, 2008), com diversas atividades biológicas, entre elas, atividade antibacteriana, antifúngica, antiparasitária, antiviral e antioxidante (Donia & Hamann, 2003; Kumar *et al.*, 2008).

1.1. Necessidade de novos Antibióticos

Os antibióticos foram considerados como "medicamentos milagrosos", quando se tornaram disponíveis há meio século, mas a sua popularidade rapidamente conduziu ao uso excessivo. Durante a última década tornou-se claro que os antibióticos estão a perder eficácia e o tratamento de infeções bacterianas é cada vez mais difícil devido à capacidade das bactérias de desenvolver resistência aos agentes antimicrobianos.

Os agentes antimicrobianos são frequentemente classificados de acordo com o seu mecanismo de ação principal. Esses mecanismos incluem a interferência na síntese da parede celular (por exemplo, β -lactâmicos e glicopeptídeos), inibição da síntese de proteínas (macrólidos e tetraciclinas), interferência na síntese dos ácidos nucleicos (fluoroquinolonas e rifampicina), inibição de uma via metabólica (trimetoprim-sulfametoxazol) e rutura da estrutura da membrana bacteriana (polimixinas e daptomicina) (Tenover, 2006). As bactérias podem ser intrinsecamente resistentes a

mais de uma classe de agentes antimicrobianos, ou podem adquirir resistência por mutação *de novo* (nova mutação que não foi herdada da colônia de origem), ou através da aquisição de genes de resistência de outros organismos. Os genes de resistência adquiridos podem permitir a uma bactéria produzir enzimas que destroem o fármaco antibacteriano, expressar sistemas que impedem que o fármaco atinja o seu alvo intracelular, modificar o local alvo do fármaco, ou produzir uma via metabólica alternativa que ignora a ação do fármaco (Tenover, 2006). A aquisição de novo material genético por bactérias suscetíveis aos agentes antimicrobianos a partir de estirpes resistentes pode ocorrer através de conjugação, transformação ou transdução, com transposões muitas vezes a facilitarem a incorporação de múltiplos genes de resistência no genoma ou plasmídeos do hospedeiro (Tenover, 2006). O uso de agentes antibacterianos cria uma pressão seletiva que leva ao aparecimento de estirpes resistentes (Tenover, 2006).

1.2. Diferenças entre Algas e Plantas/Definição

Embora o termo alga não tenha legitimidade taxonômica é no entanto, geralmente usado para indicar um conjunto polifilético (organismos que não partilham uma origem comum, mas seguem várias linhas evolutivas independentes) e artificial de organismos fotossintéticos. Segundo esta definição, as plantas poderiam ser consideradas uma divisão das algas (Barsanti & Gualtieri, 2006). Algumas algas, em especial as Chlorophyta, e as plantas terrestres produzem os mesmos compostos de armazenamento, usam estratégias de defesa semelhantes contra predadores e parasitas, existindo uma forte semelhança morfológica entre algumas delas (Barsanti & Gualtieri, 2006). No entanto existem diferenças entre plantas e algas. As plantas apresentam um elevado nível de diferenciação com raízes, folhas, caules, sistemas vasculares xilema/floema; as estruturas reprodutivas estão revestidas por células estéreis e apresentam exclusivamente reprodução sexuada com alternância de gerações entre um gametófito haploide e um esporófito diploide (Barsanti & Gualtieri, 2006). Por outro lado, as algas não tem raízes, folhas, caules, ou sistemas vasculares bem definidos; não formam embriões, todas as células das suas estruturas reprodutivas são células potencialmente férteis, e células estéreis com função de

proteção estão ausentes. Apresentam, no entanto, tanto reprodução sexuada como assexuada. As algas surgem em diferentes formas, como uma única célula microscópica, aglomerados multicelulares macroscópicos, colónias ramificadas, ou formas mais complexas de folha ou lâmina, que contrastam fortemente com a uniformidade das plantas vasculares (Barsanti & Gualtieri, 2006).

1.3. Algas

O termo alga refere-se às macro- e microalgas. Estima-se que existam cerca de 10 milhões de espécies algais, sendo a maior parte microalgas (Barsanti & Gualtieri, 2006).

As algas podem ser encontradas praticamente em qualquer lugar, desde nascentes de água doce a oceanos extremamente salinos e regiões polares, apresentando tolerância a uma vasta gama de valores de pH, temperatura, turbidez e concentração de O₂ e CO₂ (Barsanti & Gualtieri, 2006).

Estes organismos apresentam formas de vida planctónicas, como a maioria das espécies unicelulares, vivendo em suspensão nas zonas fóticas (corpo de água que recebe luz solar suficiente para que ocorra fotossíntese) (Barsanti & Gualtieri, 2006). Também podem apresentar formas de vida bentónicas, ligadas ao fundo ou vivendo no meio dos sedimentos, limitadas a zonas pouco profundas devido à rápida diminuição da luz com a profundidade (Barsanti & Gualtieri, 2006).

1.4. Macroalgas

As macroalgas são organismos marinhos multicelulares fotossintéticos. São classificadas com base nos seus pigmentos constituintes em algas vermelhas (Rhodophyta), contendo pigmentos r, b-ficoeritrina e r-ficocianina, clorofila *a*, α - e β -carotenos e luteína; algas castanhas (Phaeophyta), com clorofila *a* e *c*, α -, β - e ϵ -carotenos e fucoxantina; e algas verdes (Chlorophyta), com clorofilas *a* e *b*, α -, β - e γ -carotenos, luteína e prasinoxantina (Barsanti & Gualtieri, 2006).

As algas vermelhas e as castanhas habitam predominantemente ecossistemas marinhos, enquanto as algas verdes são ubíquas em águas doces, habitats marinhos e terrestres (Barsanti & Gualtieri, 2006).

O agar, alginato e carragenina são hidrocolóides, extraídos de várias macroalgas vermelhas e castanhas, e são aplicados na indústria alimentar. As macroalgas contêm também nutrientes benéficos como vitaminas, minerais, lípidos, esteróis, aminoácidos e antioxidantes, entre outros (Barsanti & Gualtieri, 2006).

1.5. Microalgas

As microalgas são organismos marinhos unicelulares e fotossintéticos, encontram-se principalmente em meios marinhos, águas doces e solos húmidos (Derner *et al.*, 2006). As microalgas planctónicas ou fitoplâncton constituem a base da cadeia alimentar marinha e produzem aproximadamente 50% do oxigénio molecular disponível no planeta (Barsanti & Gualtieri, 2006).

Abrangem organismos com dois tipos de estrutura celular: procariótica, com representantes nas divisões Cyanophyta (cianobactérias) e Prochlorophyta; e eucariótica, com representantes nas divisões Chlorophyta, Euglenophyta, Rhodophyta, Haptophyta, Heterokontophyta, Cryptophyta e Dinophyta (Derner *et al.*, 2006).

Como acontece nas macroalgas, cada classe de microalgas apresenta a sua própria combinação de pigmentos e, por consequência, coloração distinta. Os três principais grupos de pigmentos encontrados nas microalgas são as clorofilas, os carotenoides e as ficobilinas (Derner *et al.*, 2006).

A elevada diversidade de espécies de microalgas faz com que seja grande a variedade de compostos bioquímicos sintetizados por estes organismos, sendo por isso, fonte de uma quantidade potencialmente ilimitada de produtos (Pulz & Gross, 2004). Entre esses compostos encontram-se ácidos gordos polinsaturados, ficobilinas, polissacáridos, vitaminas, esteróis e carotenoides (Derner *et al.*, 2006).

1.6. Ervas marinhas

As ervas marinhas são angiospérmicas (plantas com flor) com ancestrais terrestres, e são as únicas que estão adaptadas para viver submersas em água salgada.

Podem ser encontradas desde a zona intertidal (zona entremarés) na costa até 50 a 60 metros de profundidade (Borum *et al.*, 2004). Ao contrário das algas, as ervas marinhas têm caule, folhas, flores e frutos (McKenzie, 2008). Das cerca de 60 espécies

de ervas marinhas no mundo, apenas 4 são nativas das águas europeias: *Zostera marina*, *Z. noltii*, *Cymodocea nodosa* e *Posidonia oceanica* (Borum *et al.*, 2004).

Diversos extratos de ervas marinhas têm sido usados como agentes curativos de várias doenças, como antibiótico, antihelmíntico, antipirético, antitumoral, antidiarreia, tratamento da tosse, cicatrização de feridas, tratamento de cálculos biliares e bócio (Umamaheshwari *et al.*, 2009). Foram descritas diversas atividades biológicas de ervas marinhas, entre elas, atividade antibacteriana, antialgal, antifúngica, antiviral e antioxidante (Kumar *et al.*, 2008).

1.7. Halófitas

Plantas halófitas são a designação das plantas que vivem em meios salgados, como os sapais. Os sapais formam-se apenas onde a costa está protegida da ação direta das ondas e correntes marítimas e há influência de água doce, deposição de sedimentos e declives suaves, por isso só ocorrem em estuários tranquilos e baías (Costa, 2001).

As plantas no sapal situam-se desde o nível médio ao superior da zona entremarés, em que a ação das correntes e das ondas não causam erosão e onde as plantas não estão permanentemente submersas (Costa, 2001).

As espécies de sapal chegam a suportar concentrações de sal, durante períodos mais ou menos longos, superiores às águas do mar (Costa, 2001), e dividem-se em três grupos: (1) halófitas obrigatórias, que necessitam de sais para o seu desenvolvimento (como exemplo temos várias espécies dos géneros *Salicornia*, *Sarcocornia*, *Arthrocnemum*, *Limonium*, *Suaeda*, *Limoniastrum*, *Atriplex*, *Frankenia*, *Spartina* e *Puccinellia*); (2) halófitas preferenciais, que preferem sais para o seu desenvolvimento (*Scirpus maritimus var. compactus*, *Juncus maritimus*, *Salsola vermiculata*, *Hordeum marinum*, entre outras); e (3) halófitas de subsistência, ou seja, as que toleram sais durante o seu desenvolvimento (*Phragmites australis*, *Juncus acutus*, *Cotula coronopifolia*, *Beta vulgare subsp. maritima*, entre outras) (Costa, 2001).

Em África, a espécie *Carpobrotus edulis* é usada como remédio tradicional numa variedade de infeções bacterianas e fúngicas incluindo tratamento de

queimaduras, feridas, eczema, dor de dentes e dor de ouvidos (Buwa & Afolayan, 2009).

Foram descritas diversas atividades biológicas de plantas halófitas, entre elas, atividade antibacteriana, antialgal, antifúngica, e antioxidante (Van der Watt & Pretorius, 2001; Lellau & Liebezeit, 2003; Buwa & Afolayan, 2009).

1.8. Descrição de algumas espécies microbianas com importância a nível clínico

1.8.1. *Bacillus cereus*

São bacilos Gram-positivos com 1 por 3 a 5 μm , produtores de esporos aerobicamente (Fig. 1) (Ferreira & Sousa, 2000).

B. cereus provoca toxi-infeções alimentares, como doença emética ou síndrome diarreico, devido à produção de exotoxinas. É resistente aos antibióticos β -lactâmicos devido à forte produção de β -lactamases, sendo também resistente a trimetoprim-sulfametoxazol (Ferreira & Sousa, 2000).

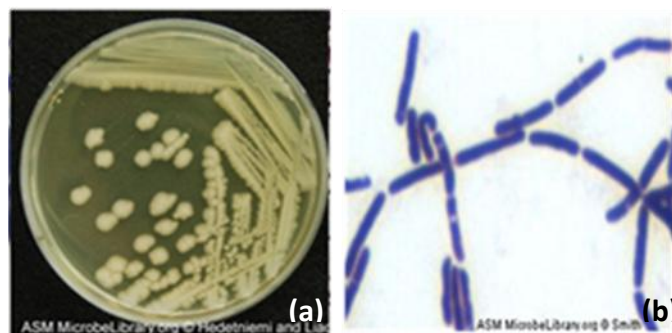


Figura 1 - Riscado (a) e coloração Gram (b) de *B. cereus*. Fonte: <http://www.microbelibrary.org>.

1.8.2. *Staphylococcus aureus*

São cocos Gram-positivos, com 0,5 a 1,5 μm de diâmetro formando agregados em cacho, anaeróbios facultativos, produzem catalase e coagulase (Fig. 2) (Ferreira & Sousa, 2000).

São das principais responsáveis por infeções frequentemente adquiridas, tanto na população como no meio hospitalar. As infeções, com invasão e lesão dos tecidos, podem ter diferentes localizações e gravidade (furúnculo, impetigo, celulite, abscessos,

infecções de queimaduras e de feridas, endocardites, osteomielites, artrites, pneumonias, empiemas, pielonefrites, meningites ou septicemias). As toxinas produzidas por *S. aureus* podem originar três quadros clínicos específicos e distintos: intoxicação alimentar estafilocócica (gastroenterite), síndrome da pele escaldada e síndrome do choque tóxico (Ferreira & Sousa, 2000).

A maioria das infecções por *S. aureus* são causadas por estirpes resistentes à penicilina G. A resistência deve-se à produção de β -lactamases, enzimas que destroem as penicilinas (Ferreira & Sousa, 2000).

São bactérias que, muito frequentemente, adquirem resistências aos antibióticos e as transmitem entre si (Ferreira & Sousa, 2000).



Figura 2 - Morfologia (a), riscado (b) e coloração Gram (c) de *S. aureus*. Fonte: <http://www.microbelibrary.org>.

1.8.3. *Escherichia coli*

São bactérias entéricas, que são bacilos retos com 1 por 3 μm (Madigan, 1996), Gram-negativos, anaeróbios facultativos, com catalase positiva e oxidase negativa (Fig. 3) (Ferreira & Sousa, 2000). Esta espécie origina frequentemente infecções urinárias, gastroenterites, pneumonias, septicemias e abscessos (Ferreira & Sousa, 2000), e pode ser resistente a um elevado número de antibióticos, mas uma estirpe raramente é resistente a mais de 2 ou 3 fármacos distintos. É resistente aos antibióticos β -lactâmicos devido à produção de β -lactamases (Ferreira *et al.*, 2000).

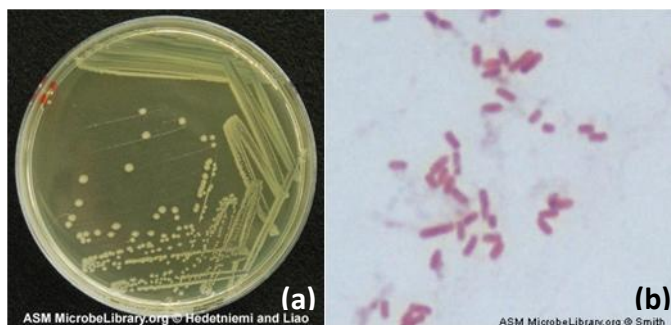


Figura 3 - Riscado (a) e coloração Gram (b) de *E. coli*. Fonte: <http://www.microbelibrary.org>.

1.8.4. *Pseudomonas aeruginosa*

São bacilos Gram-negativos, retos ou ligeiramente curvados com 0,5 a 1,0 μm por 1,5 a 4,0 μm , aeróbios, com testes positivos para a catalase e oxidase (Fig. 4) (Ferreira & Sousa, 2000). É um agente patogénico oportunista emergente, tratando-se de uma espécie resistente a vários antibióticos, capaz de sobreviver e multiplicar-se em ambientes nutricionalmente limitados, particularmente em ambientes hospitalares húmidos (Ferreira & Sousa, 2000).

As infeções por *P. aeruginosa* surgem principalmente em doentes que previamente já sofriam de outra doença ou lesão, podendo originar três tipos principais de infeções graves: infeção aguda e localizada dos olhos, após lesão da córnea ou cirurgia; infeção crónica dos pulmões de doentes com fibrose quística e infeção grave e disseminada em doentes com o sistema imunológico deficiente ou que apresentem queimaduras graves (Ferreira & Sousa, 2000).

A perigosidade das infeções por esta espécie depende da predominância de estirpes resistentes a antibióticos (Ferreira & Sousa, 2000).



Figura 4 - Morfologia da colónia (a), riscado (b) e coloração Gram (c) de *P. aeruginosa*. Fonte: <http://www.microbelibrary.org>.

2. Objetivo

O objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade antibacteriana de extratos de metanol de diferentes espécies de macro- e microalgas, ervas marinhas e plantas halófitas, contra estirpes bacterianas potencialmente patogénicas, nomeadamente *B. cereus*, *S. aureus*, *E. coli* e *P. aeruginosa*, pelo método de difusão em agar.

3. Materiais e métodos

3.1. Material biológico

Neste trabalho utilizaram-se 9 espécies de macroalgas (*Codium fragile*, *Codium* sp., *Cystoseira nodicaulis*, *C. tamariscifolia*, *Dictyota dichotoma*, *D. spiralis*, *Enteromorpha* sp, *Sargassum vulgare* e *Taonia atomaria*), 2 espécies de microalgas (*Botryococcus braunii* e *Isochrysis galbana* clone T-ISO), 8 espécies de plantas halófitas (*Carpobrotus edulis*, *Frankenia laevis*, *Mesembrianthemum cristalinum*, *Phragmites australis*, *Salicornia ramosissima*, *Salsola vermiculata*, *Sarcocornia fruticosa* e *Tamarix africana*) e 1 erva marinha (*Cymodocea nodosa*).

As diferentes espécies de macroalgas foram colhidas na praia de Olhos d'Água (Albufeira) entre julho e novembro de 2009, e identificadas *in situ* pelo Dr. A. Engelen (CCMAR, Universidade do Algarve). As amostras foram lavadas no local de colheita em água salgada, mantidas no frio em caixas térmicas até à chegada ao laboratório onde foram cuidadosamente lavadas com água da torneira. Após várias lavagens foram liofilizadas e armazenadas a -20°C. As amostras de microalgas foram fornecidas pelo Laboratório Experimental de Organismos Aquáticos (LEOA, UAlg) e pela NECTON S.A. A biomassa algal obtida a partir de culturas monoclonais mantidas no laboratório foi recolhida por centrifugação, liofilizada e armazenada a -20°C. As plantas halófitas foram colhidas em maio de 2010 (Praia de Faro e Ludo), e identificadas pelo Dr. Manuel João Pinto (Museu Nacional de História Natural do Jardim Botânico da Universidade de Lisboa). As amostras foram secas ao ar, moídas e armazenadas a -20°C.

3.2. Preparação dos extratos metanólicos

Para a obtenção do extrato metanólico, alíquotas de 1 g das amostras moídas foram homogeneizadas num balão de *Erlenmeyer* com 40 ml de metanol e extraídas durante 16 h com agitação. Os extratos assim obtidos foram centrifugados (3000 rpm, 15 min, temperatura ambiente) e o sobrenadante cuidadosamente recolhido. O solvente foi evaporado num evaporador rotativo sob vácuo a uma temperatura de

40°C, e o resíduo seco foi pesado e ressuspensão em metanol de modo a obter-se uma concentração final de 50 mg/ml.

3.3. Estirpes bacterianas

Neste trabalho foram utilizadas 4 estirpes bacterianas potencialmente patogênicas para o Homem, nomeadamente *B. cereus* NCTC 7464, *S. aureus* NCTC 6571 (Gram-positivas), *E. coli* NCTC 9001 e *P. aeruginosa* NCTC 10662 (Gram-negativas). As estirpes utilizadas estão catalogadas e foram adquiridas da *National Collection of Type Cultures* (NCTC).

3.4. Método de difusão em agar

A atividade antibacteriana foi determinada de acordo com os protocolos padronizados pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2009), usando o método de difusão em agar, que se passa a descrever em seguida.

Como ponto de partida, fizeram-se riscados de cada estirpe bacteriana em placas de Petri contendo meio de cultura Mueller-Hinton agar (MHA) e incubaram-se a uma temperatura de 37°C durante 18 a 24 h.

As estirpes bacterianas foram suspensas em soluto de Ringer estéril e a turbidez foi ajustada a 0.5 McFarland (aproximadamente $1-2 \times 10^8$ UFC/ml de *E. coli*) o que corresponde a uma absorvância de 0,08-0,13 medida a um comprimento de onda de 625 nm (CLSI, 2009).

As placas de Petri (9 cm de diâmetro) contendo MHA (4 mm de espessura de meio de cultura) foram inoculadas com 100 µl da suspensão bacteriana com uma zaragatoa estéril por espalhamento à superfície do meio. Após 10 minutos, discos de papel estéreis (6 mm de diâmetro) foram impregnados com 20 µl de extrato (1 mg/disco, a partir de uma solução stock a 50 mg/ml). Foram testados dois métodos de colocação dos discos: (1) diretamente nas placas de Petri (discos húmidos), e (2) deixados a secar ao ar e posteriormente colocados nas placas de Petri (discos secos).

Após aplicação dos discos deixou-se pré-difundir durante cerca de 15 minutos e as placas foram incubadas a 37°C durante 18 a 24 h. Depois da incubação todas as placas foram examinadas e a atividade antibacteriana dos extratos foi avaliada com

base na presença e diâmetro (em mm) de uma zona de inibição de crescimento em volta dos discos.

Como controlo negativo foram utilizados discos brancos impregnados com 20 µl de metanol enquanto discos com vários antibióticos, (ácido nalidíxico, 30 µg/disco; gentamicina, 10 µg/disco; penicilina G, 10 unidades/disco e tetraciclina, 30 µg/disco), foram usados como controlo positivo. De acordo com a zona de inibição de crescimento observada, a estirpe bacteriana é classificada como sensível, intermédia ou resistente, em conformidade com tabelas publicadas (CLSI, 2009).

3.5. Apresentação dos dados e Tratamento estatístico

Os resultados foram apresentados sob a forma de média ± erro padrão (EP) e cada ensaio foi repetido no mínimo 3 vezes. Os dados foram submetidos a uma análise estatística, utilizando o teste de Duncan através do software *SPSS Statistics 17.0* e assumindo um $p < 0,05$ (nível de significância de 95%).

4. Resultados e Discussão

A atividade antibacteriana *in vitro* dos extratos metanólicos foi avaliada com base na presença ou ausência e diâmetro (em mm) de uma zona de inibição de crescimento em volta dos discos.

Numa primeira fase foram realizados ensaios com os 11 extratos das macro- e microalgas, utilizando discos húmidos (discos brancos impregnados com o extrato metanólico diretamente na placas de Petri com MHA). Observou-se que quando existiam zonas de inibição de crescimento estas eram muito irregulares. Para além disso, os diâmetros das zonas de inibição dos extratos eram semelhantes aos diâmetros das zonas de inibição do metanol (8 a 9 mm; Fig. 5). Estas observações indicam que o metanol inibe, por contacto direto, o crescimento bacteriano mas não esclarecem sobre a possível atividade antibacteriana dos extratos testados, visto que a zona de inibição de crescimento observada pode dever-se exclusivamente ao metanol.

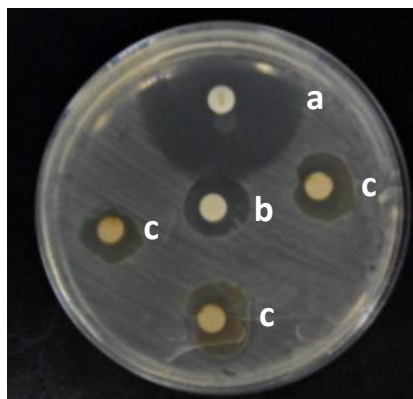


Figura 5 - Zonas de inibição do extrato metanólico de *C. tamariscifolia* para o *S. aureus*. a) Controlo positivo: penicilina G, 10 unidades/disco, b) Controlo negativo: metanol, c) Discos húmidos.

Deste modo, foram realizados novos ensaios em que os discos com o extrato foram deixados a secar ao ar e posteriormente colocados nas placas de Petri (discos secos) (Tabela 1). Neste caso, não foram observadas zonas de inibição de crescimento bacteriano nos controlos negativos (metanol após evaporação) e todas as substâncias de referência (antibiótico de referência para cada espécie bacteriana) resultaram em inibição do crescimento bacteriano (Tabelas 1 e 2).

Tabela 1 - Diâmetro das zonas de inibição (mm) observadas para os extratos metanólicos de macro- e microalgas e erva marinha testados.

Espécie	Diâmetro da zona de inibição (mm)			
	<i>B. cereus</i>	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>
Macroalgas				
<i>C. fragile</i>	–	–	–	–
<i>Codium sp</i>	–	–	–	–
<i>C. nodicaulis</i>	–	8,44 ± 0,53	–	–
<i>C. tamariscifolia</i>	–	11,12 ± 0,78	–	–
<i>D. dichotoma</i>	–	–	–	–
<i>D. spiralis</i>	–	–	–	–
<i>Enteromorpha sp</i>	–	–	–	–
<i>S. vulgare</i>	–	–	–	–
<i>T. atomaria</i>	–	–	–	–
Microalgas				
<i>B. braunii</i>	–	–	–	–
<i>I. galbana</i>	–	–	–	–
Erva marinha				
<i>C. nodosa</i>	n.t.	–	–	–
Antibióticos				
tetraciclina ^a	31,44 ± 1,23	n.t.	n.t.	n.t.
penicilina G ^b	n.t.	36,90 ± 2,95	n.t.	n.t.
ácido nalidíxico ^c	n.t.	n.t.	25,75 ± 1,08	n.t.
gentamicina ^d	n.t.	n.t.	n.t.	16,86 ± 0,97
Metanol*	–	–	–	–

Diâmetro da zona de inibição (mm) inclui o diâmetro do disco (6 mm); valores representam média ± desvio padrão de 3 réplicas; (–) sem inibição.

*Controlo negativo; ^atetraciclina, 30 µg/disco; ^bpenicilina G, 10 unidades/disco; ^cácido nalidíxico, 30 µg/disco; ^dgentamicina, 10 µg/disco.

Observaram-se zonas de inibição em *S. aureus* na presença dos extratos metanólicos de *C. nodicaulis* (8,44 ± 0,53 mm) e *C. tamariscifolia* (11,12 ± 0,78 mm) (Fig. 6). Esta observação está de acordo com estudos prévios, onde outros autores verificaram que as frações de hexano, éter etílico e diclorometano do extrato da alga *C. tamariscifolia* demonstraram atividade antimicrobiana (Abourriche *et al.*, 1999).

Embora com valores de diâmetro muito inferiores aos observados para o antibiótico penicilina G (10 unidades/disco: 36,90 ± 2,95 mm; Tabela 1) os resultados

obtidos no presente trabalho demonstram o potencial antibacteriano de *C. tamariscifolia* tendo o extrato metanólico inibido o crescimento de *S. aureus*.

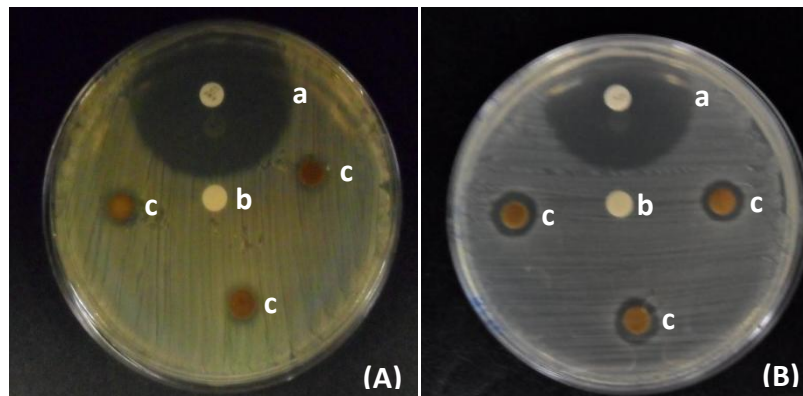


Figura 6 - Zonas de inibição de crescimento de *S. aureus* na presença do extrato metanólico de (A) *C. nodicaulis* e (B) *C. tamariscifolia* (discos secos). a) Controlo positivo: penicilina G, 10 unidades/disco, b) Controlo negativo: metanol, c) Discos secos.

Os restantes extratos metanólicos de macro- e microalgas e erva marinha não demonstraram atividade em relação às estirpes estudadas.

Foi previamente relatado que extratos de metanol, diclorometano e hexano de *C. fragile* apresentaram fraca atividade antibacteriana (Koz *et al.*, 2009). No entanto, no presente estudo o extrato metanólico de *C. fragile* testado mostrou-se inativo em relação às estirpes estudadas.

Investigações prévias demonstraram que extratos de hexano da alga castanha *D. dichotoma* resultaram em inibição tanto de bactérias como fungos, o extrato de hexano de *T. atomaria* foi testado apenas em relação a fungos e revelou-se inativo (Moreau *et al.*, 1984).

Outro estudo mostrou uma alta percentagem de espécies de macroalgas com atividade antimicrobiana, 73% no caso das Chlorophyta (algas verdes), 69% em Rhodophyta (algas vermelhas) e 53% em Phaeophyta (algas castanhas) (Gonzalez del Val *et al.*, 2001; Koz *et al.*, 2009).

Em 1989, Kellam & Walker detetaram atividade antibacteriana *in vitro* em 28 de 132 extratos orgânicos de microalgas testados e constataram como outros investigadores (Moreau *et al.*, 1984), que o hexano produzia zonas de inibição maiores, o que provavelmente reflete a natureza apolar dos compostos bioativos das microalgas testadas.

Várias espécies de ervas marinhas produzem compostos antimicrobianos que podem agir para reduzir ou controlar o crescimento microbiano. Kumar *et al* (2008) demonstraram a atividade antibacteriana de 3 espécies de ervas marinhas *C. serrulata*, *Halophila ovalis* e *Z. capensis*, sendo que o acetato de etilo demonstrou ser o melhor solvente para o isolamento de compostos bioativos, seguido do metanol (Kumar *et al.*, 2008).

A espécie *S. aureus* tem-se revelado a bactéria mais suscetível, e *E. coli* a menos suscetível à inibição por extratos de algas em vários estudos, independentemente do solvente utilizado na extração da biomassa algal (Kellam & Walker, 1989). Neste trabalho, *S. aureus* foi a bactéria mais sensível aos extratos. Trata-se de uma bactéria Gram-positiva, ou seja, tem uma parede celular composta principalmente por peptidoglicano sem membrana externa de proteção. Isto permite uma fácil penetração dos compostos bioativos nas células. As bactérias Gram-negativas, como *E. coli*, têm menos peptidoglicano na sua parede celular, e contêm uma membrana externa composta por lipopolissacáridos, lipoproteínas e outras moléculas complexas (Madigan, 1996) que tornam a parede celular menos permeável do que a das bactérias Gram-positivas.

Os extratos metanólicos de plantas halófitas testados não demonstraram atividade antibacteriana nas estirpes estudadas (Tabela 2).

No entanto, extrato metanólico de *S. vermiculata* demonstrou anteriormente atividade antibacteriana inibindo o crescimento de *S. aureus* e *P. aeruginosa* (Bouaziz *et al.*, 2009).

Segundo Buwa & Afolayan (2009) o extrato etanólico de *C. edulis* exibiu forte atividade contra bactérias Gram-positivas e fraca atividade contra bactérias Gram-negativas. No entanto, neste trabalho o extrato metanólico de *C. edulis* não apresentou atividade em relação a todas as estirpes estudadas, o que provavelmente reflete a natureza apolar dos componentes bioativos presentes em *C. edulis*. No entanto, um estudo realizado por Martins *et al.* (2005) mostrou que o extrato de metanol de *C. edulis*, inativo contra o *S. aureus* metilina-resistente ou contra o multirresistente *M. tuberculosis*, inibe o crescimento destas duas bactérias, uma vez fagocitadas por macrófagos humanos derivados de monócitos.

Tabela 2 - Diâmetro das zonas de inibição (mm) observadas para os extratos de plantas halófitas testados.

Espécie	Diâmetro da zona de inibição (mm)			
	<i>B. cereus</i>	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>
<i>C. edulis</i>	n.t.	–	–	–
<i>F. laevis</i>	n.t.	–	–	–
<i>M. cristalinum</i>	n.t.	–	–	–
<i>P. australis</i>	n.t.	–	–	–
<i>S. ramosissima</i>	n.t.	–	–	–
<i>S. vermiculata</i>	n.t.	–	–	–
<i>S. fruticosa</i>	n.t.	–	–	–
<i>T. africana</i>	n.t.	–	–	–
Antibióticos				
tetraciclina ^a	31,44 ± 1,23	n.t.	n.t.	n.t.
penicilina G ^b	n.t.	36,90 ± 2,95	n.t.	n.t.
ácido nalidíxico ^c	n.t.	n.t.	25,75 ± 1,08	n.t.
gentamicina ^d	n.t.	n.t.	n.t.	16,86 ± 0,97
Metanol*	n.t.	–	–	–

Diâmetro da zona de inibição (mm) inclui o diâmetro do disco (6 mm); valores representam média ± desvio padrão de 3 réplicas; n.t. - não testado, (–) sem inibição.

*Controlo negativo; ^atetraciclina, 30 µg/disco; ^bpenicilina G, 10 unidades/disco; ^cácido nalidíxico, 30 µg/disco; ^dgentamicina, 10 µg/disco.

O facto de não se ter detetado atividade antibacteriana nos extratos metanólicos da maioria das espécies estudadas, não significa que estas não possuam atividade antimicrobiana, uma vez que a utilização de outros solventes, com diferentes polaridades, poderia extrair compostos bioativos diferentes. Devido às vastas diferenças na natureza dos constituintes químicos encontrados numa planta ou alga, não há solvente que seja capaz de extrair todos os compostos por si próprio.

São vários os solventes utilizados para a extração de compostos antibióticos da biomassa algal, tais como hexano, metanol, etanol e diclorometano (Kellam & Walker, 1989). Acetato de etilo, acetona, água, clorofórmio, éter etílico e éter de petróleo também são usados (Tuney *et al.*, 2006; Abedin & Taha, 2008; Kumar *et al.*, 2008; Bouaziz *et al.*, 2009; Koz *et al.*, 2009).

Os resultados de Bouaziz *et al.* (2009) mostraram que há uma variação significativa no rendimento de extração entre espécies de plantas para o mesmo solvente e entre solventes para a mesma espécie de planta. Já foi anteriormente demonstrado que a atividade antibacteriana depende tanto da espécie de alga como da eficiência do método de extração (Tuney *et al.*, 2006). E foi também comparada a atividade antimicrobiana entre extratos de algas secas e frescas, e verificou-se que todos os organismos teste foram mais sensíveis aos extratos de algas frescas, possivelmente devido à perda de compostos ativos voláteis durante o processo de secagem das algas (Tuney *et al.*, 2006).

A eficácia dos extratos de algas é influenciada também por fatores como localização e sazonalidade (Koz *et al.*, 2009). Para além disso, já foi comparada a atividade antimicrobiana das algas férteis com algas não férteis (estado vegetativo), tendo-se analisado as espécies colhidas em diferentes épocas e observado variação da atividade antimicrobiana com as estações, sendo que os extratos de algas férteis foram praticamente os únicos ativos (Moreau *et al.*, 1984).

Para além dos fatores acima referidos também fatores como evaporação, solubilidade e taxa de difusão do extrato no agar afetam a concentração dos compostos bioativos naturais e por isso a sua eficácia antimicrobiana.

5. Conclusão e Perspetivas futuras

Os resultados da determinação da atividade antibiótica através do método de difusão em agar indicam que os extratos metanólicos de *C. nodicaulis* e *C. tamariscifolia* apresentam atividade antibacteriana. Os restantes extratos de algas, ervas marinhas e plantas halófitas não demonstraram, porém, qualquer atividade antibacteriana, para as estirpes e concentrações de extrato testados. No entanto, tal não indica que as espécies em questão não possuem atividade antibiótica. Para verificar isso, seria necessário em trabalhos seguintes testar outros solventes, nomeadamente, hexano, diclorometano e clorofórmio, de modo a poder obter uma gama mais abrangente de compostos bioativos e também testar a atividade antimicrobiana em relação a outras estirpes bacterianas, fungos e leveduras.

É indispensável quantificar a atividade antibacteriana dos extratos metanólicos de *C. nodicaulis* e *C. tamariscifolia* através da determinação da CMI (Concentração Mínima Inibitória) por métodos de diluição em meio de cultura líquido.

6. Bibliografia

Abedin R. M.,Taha H. M. (2008) Antibacterial and Antifungal Activity of Cyanobacteria and Green Microalgae; *Global Journal of Biotechnology & Biochemistry*, **3**:22-31.

Abourriche A., Charrouf M., Berrada M., Bennamara A., Chaib N., Francisco C. (1999) Antimicrobial activities and cytotoxicity of the brown alga *Cystoseira tamariscifolia*; *Fitoterapia*, **70**:611-614.

Barsanti L., Gualtieri P. (2006) *Algae: Anatomy, Biochemistry and Biotechnology*; Taylor and Francis Group; Boca Raton, Florida.

Blunt J. W., Copp B. R., Hu W.P., Munro M. H., Northcote P. T., Prinsep, M. R. (2009) Marine natural products; *Natural Product Reports*, **26**:170–244.

Borum J., Duarte C. M., Krause-Jensen D., Greve, T. M. (2004) *European seagrasses: an introduction to monitoring and management*; The Monitoring and Managing of European Seagrasses (M&MS) project.

Bouaziz M., Dhouib A., Louki S., Boukhris M., Sayadi S. (2009) Polyphenols content, antioxidant and antimicrobial activities of extracts of some wild plants collected from the south of Tunisia; *African Journal of Biotechnology*, **8**:7017-7027.

Buwa L., Afolayan A. J. (2009) Antimicrobial activity of some medicinal plants used for the treatment of tuberculosis in the Eastern Cape; *African Journal of Biotechnology*, **8**:6683-6687.

CLSI (2009) *Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved Standard—10th edition; CLSI document M02-A10*; Clinical and Laboratory Standards Institute; Wayne, PA.

CLSI (2009) *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; 9th Informational Supplement; CLSI document M100-S19*; Clinical and Laboratory Standards Institute; Wayne, PA.

Costa J. C. (2001) *Tipos de vegetação e adaptações das plantas do litoral de Portugal continental*; In Albergaria Moreira, M.E., A. Casal Moura, H.M. Granja & F.Noronha (ed.)

Homenagem (in honorio) Professor Doutor Soares de Carvalho: 283-299. Braga. Universidade do Minho.

Derner R. B., Ohse S., Villela M., Carvalho S. M., Fett R. (2006) Microalgas, produtos e aplicações; *Ciência Rural*, **36**:1959-1967.

Donia M., Hamann M. T. (2003) Marine natural products and their potential; *The Lancet Infectious Diseases*, **3**:338-48.

Ferreira W. F., Sousa J. C. (2000) *Microbiologia - Volume 2*; Lidel - Edições Técnicas, Lda.

Gonzalez del Val A., Platas G., Basilio A., Cabello A., Gorrochategui J., Suay I., Vicente F., Portillo E., Jimenez del Rio M., Reina G.G., Pelaez F. (2001) Screening of antimicrobial activities in red, green and brown macroalgae from Gran Canaria (Canary Islands, Spain); *Int. Microbiol*, **4**:35-40.

Kellam S. J., Walker, J.M. (1989) Antibacterial activity from marine microalgae in laboratory culture; *European Journal of Phycology*, **24**:191-194.

Koz F.F., Yavasoglu U.K., Demirel Z., Sukatar A. Ozdemir G. (2009) Antioxidant and Antimicrobial Activities of *Codium fragile* (Suringar) Hariot (Chlorophyta) Essential Oil and Extracts; *Asian Journal of Chemistry*, **21**:1197-1209.

Kumar C. S., Sarada D. V. L., Gideon T. P., Rengasamy R. (2008) Antibacterial activity of three South Indian seagrasses, *Cymodocea serrulata*, *Halophila ovalis* and *Zostera capensis*; *World J Microbiol Biotechnol*, **24**:1989–1992.

Lellau T. F., Liebezeit G. (2003) Activity of Ethanolic Extracts of Salt Marsh Plants from the Lower Saxonian Wadden Sea Coast Against Microorganisms; *Senckenbergiana marifima*, **32**:177-181.

Madigan M. T. (1996) *Brock, Biology of Microorganisms*; 8th Edition; Prentice-Hall.

Martins M., Ordway D., Kristiansen M., Viveiros M., Leandro C., Molnar J. (2005) Inhibition of the *Carpobrotus edulis* methanol extract on the growth of phagocytosed multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*; *Fitoterapia*, **76**:96–99.

McKenzie L. (2008) *Seagrass Educators Handbook*. Obtido a 2/12/2010, em http://www.seagrasswatch.org/Info_centre/education/Seagrass_Educators_Handbook.pdf

Moreau J., Pesando D., Caram B. (1984) Antifungal and antibacterial screening of Dictyotales from the French Mediterranean coast; *Hydrobiologia*, **116**:521-524.

Pulz O., Gross W. (2004) Valuable products from biotechnology of microalgae; *Applied Microbiology and Biotechnology*, **65**:635-648.

Saleem M., Nazir M., Ali M. S., Hussain H., Lee Y. S., Riaz N. (2010) Antimicrobial natural products: an update on future antibiotic drug candidates; *The Royal Society of Chemistry*, **27**:238–254.

Tenover F. C. (2006) Mechanisms of Antimicrobial Resistance in Bacteria; *The American Journal of Medicine*, **119**:3-10.

Tuney I., Cadirci B. H., Unal D., Sukatar A. (2006) Antimicrobial Activities of the Extracts of Marine Algae from the Coast of Urla (Üzmir, Turkey); *Turk J Biol*, **30**: 171-175.

Umamaheshwari R., Thirumaran G., Anantharaman P. (2009) Potential Antibacterial Activities of Seagrasses from Vellar Estuary, Southeast Coast of India; *Advances in Biological Research*, **3**:140-143.

Van der Watt E., Pretorius J. (2001) Purification and identification of active antibacterial components in *Carpobrotus edulis*; *Ethnopharmacol*, **76**: 87-91.