



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE BIOCIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA FUNDAMENTAL

ANNA CLAUDIA SANTOS MENDONÇA

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E ANTIMICROBIANA DE
SARGASSUM CYMOSUM COLETADA NO LITORAL PERNAMBUCANO**

RECIFE

2022

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO

CENTRO BIOCIÊNCIAS

CIÊNCIAS BIOLÓGICAS BACHARELADO

ANNA CLAUDIA SANTOS MENDONÇA

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E ANTIMICROBIANA DE
SARGASSUM CYMOSUM COLETADA NO LITORAL PERNAMBUCANO**

TCC apresentado ao Curso de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco, campus Recife, centro acadêmico biociências, como requisito para a obtenção do título de bacharel em Ciências Biológicas.

Orientador(a): Dr. Severino Alves Júnior

RECIFE

2022

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do programa de geração automática do SIB/UFPE

Mendonça, Anna Claudia Santos.

Avaliação da atividade antioxidante e antimicrobiana de *Sargassum cymosum* coletada no litoral pernambucano / Anna Claudia Santos Mendonça. - Recife, 2022.

39, tab.

Orientador(a): Severino Alves Júnior

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Biociências, Ciências Biológicas - Bacharelado, 2022.

1. Feofitas. 2. Algas marinhas. 3. Capacidade de absorbância de radicais de oxigênio. 4. Anti-infecciosos. I. Alves Júnior, Severino. (Orientação). II. Título.

570 CDD (22.ed.)

ANNA CLAUDIA SANTOS MENDONÇA

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E ANTIMICROBIANA DE
SARGASSUM CYMOSUM COLETADA NO LITORAL PERNAMBUCANO**

TCC apresentado ao Curso de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco, campus Recife, centro de biociências, como requisito para a obtenção do título de bacharel em ciências biológicas.

Aprovado em: ___/___/____.

BANCA EXAMINADORA

Profº. Dr. Severino Alves Júnior

Universidade Federal de Pernambuco

Profº. Dra. Dayane Kelly Dias do Nascimento Santos

Universidade Federal de Pernambuco

Profº. Dra. Falba Bernadete Ramos dos Anjos

Universidade Federal de Pernambuco

AGRADECIMENTOS

Começo meus agradecimentos às pessoas quatro pessoas que tornaram tudo possível, minha mãe, Sueli dos Santos, meu pai, Oswaldir Mendonça, minha irmã, Bianca Santos Mendonça, e a minha madrinha, Ana Maria Sant'Anna Lentino, que além de contribuírem com a minha formação acadêmica por um todo até esta etapa, foram as pessoas que me ajudaram a ser a mulher que sou atualmente. Eu agradeço a todo investimento feito em mim, todo apoio, todas as dificuldades, todo carinho, todo incentivo e por da sua maneira e visão de mundo, em perspectiva individual, tentarem me proporcionar o melhor que havia neles e me oferecerem o que acreditavam que era o melhor para mim. Desta maneira, inspirando em minha pessoa a dedicação de ser o melhor que eu consigo para o mundo e as pessoas ao meu redor. Eu lhes agradeço por cada situação que me proporcionaram.

Em seguida, eu agradeço as pessoas que formalmente tornaram este exato momento possível que foi meu orientador Severino Alves Júnior, a banca examinadora composta pela Dayane Kelly Dias do Nascimento Santos e Falba Bernadete Ramos dos Anjos, e ao professor da disciplina Paulo Euzébio Cabral Filho. Além disso, todos os colaboradores que conjuntamente realizaram este trabalho comigo que em prol de não se estender muito, nem prolongar muito o texto, não colocarei o nome de cada um, mas deixo meu profundo agradecimento a cada um deles. Estas pessoas me mostraram que a área da pesquisa no Brasil pode ser muitas coisas e com inúmeras dificuldades, mas também me mostraram uma coisa que a pesquisa não é, que a pesquisa não é uma atividade solitária, a pesquisa para dar certo precisa e deve ser colaborativa e que para a construção de um conhecimento maior, cada bloco importa, fazendo cada membro e cada parcela importante. E aproveitando o gancho de falar em parcela de construção de conhecimento, eu agradeço cada professor que passou na minha formação.

Por último, mas não menos relevante, eu agradeço a todas as pessoas que fizeram parte deste processo. Infelizmente, não consigo colocar o nome de cada uma delas, porque felizmente sou uma pessoa muito afortunada e por mais que esta fortuna, por enquanto, não seja monetária. Eu tenho pessoas ao meu redor que me fazem sentir assim. Estas pessoas estiveram ao meu lado em momentos tristes e felizes, permitiram-me a deixar entrar em suas vidas, conhecer e me reconhecerem, já que neste processo houveram algumas mudanças, e mesmo assim decidiram continuar ao meu lado. Eu agradeço pela paciência, o apoio, pelas experiências vividas, pela troca de perspectivas de vida, eu agradeço por me emprestarem a

família de vocês, por me ajudarem a crescer como pessoa e permitir que pudesse fazer parte do crescimento de vocês.

E como sabemos que palavras são como flores, apesar de belas, como toda vida elas tem seu tempo e como não sei quanto tempo temos aqui nesta passagem, eu dedico a todos o meu profundo agradecimento. Não somente neste texto com flores, mas também cumulativamente nos meus gestos, espero os nomes que foram citados e mesmo os nomes que não couberam aqui por alguma limitação, todos saibam o valor que tem para mim. A sua existência não passou despercebida nesse mundo, porque tornaram, pelo menos, a minha vida melhor. Muito obrigada a todos. E obrigada a quem se empenhou a ler até aqui, eu espero que tenha sentido a realização de vivenciar este momento comigo de alguma maneira.

RESUMO

As macroalgas são organismos multicelulares, autótrofos marinhos responsáveis pela produção de metabólitos secundários altamente bioativos com potencial para utilização medicinal, terapêutica e no desenvolvimento de novos fármacos. Devido a essas características as algas têm sido alvo de interesse por novos estudos. Neste sentido, o objetivo deste trabalho, avaliar a partir do extrato bruto hidroalcoólico de *Sargassum cymosum* as atividades antimicrobiana e antioxidante. Para isso foi realizados o estudo fitoquímico qualitativo, além de ensaios de atividade antimicrobiana através da metodologia da Concentração Mínima Inibitória (CMI) e Concentração Mínima Bactericida (CMB) e antioxidante pelos métodos DPPH, FRAP, Folin-Ciocalteu, fosfomolibdênio, ABTS e TFT. Os resultados apontaram um perfil fitoquímico semelhante a outras espécies de *Sargassum*, apresentando alcalóides, terpenóides, esteróides, saponinas, flavonóides, cumarinas e quinonas. A quantificação de flavonoide demonstrou $27 \pm 0,46$ μg equivalente de ácido tanico/mL. Não mostrou atividade antibacteriana frente aos organismos testados, com *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*. E obteve valores de percentual de atividade $16,78 \pm 6,1\%$ na concentração de 1 000 $\mu\text{g/mL}$ para o FRAP e o IC50 da amostra igual a 2762,17 $\mu\text{g/mL}$ de sequestro de radicais de ABTS. Portanto, mais estudos com *S. cymosum* devem ser desenvolvidos para a descoberta em novas aplicações.

Palavras-chave: Feófitas; algas marinhas; capacidade de absorbância de radicais de oxigênio; anti-infecciosos.

ABSTRACT

Macroalgae are multicellular organisms, marine autotrophs responsible for the production of highly bioactive secondary metabolites with potential for medicinal and therapeutic uses and in the development of new drugs. Due to these characteristics, algae have been the subject of interest for further studies. In this sense, the objective of this work is to evaluate the antimicrobial and antioxidant activities from the hydroalcoholic crude extract of *Sargassum cymosum*. For this, a qualitative phytochemical study was carried out, in addition to antimicrobial activity assays through the methodology of Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and Minimum Bactericidal Concentration (MBC) and antioxidant by DPPH, FRAP, Folin-Ciocalteu, phosphomolybdenum, ABTS and TFT methods. The results showed a phytochemical profile similar to other *Sargassum* species, presenting alkaloids, terpenoids, steroids, saponins, flavonoids, coumarins and quinones. Flavonoid quantification showed 270.46 µg tannic acid equivalent/mL. It did not show antibacterial activity against the tested organisms, with *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*. And obtained values of the percentage of activity 16,786.1% in the concentration of 1000 µg/mL for the FRAP and the IC₅₀ of the sample equal to 2762.17 µg/mL of radical scavenging of ABTS. Therefore, more studies with *S. cymosum* should be developed to discover new applications.

Keywords: *Phaeophyta*; seaweeds; oxygen radical absorbance capacity; anti-infective agents.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	10
2. REFERENCIAL TEÓRICO	
2.1. MACROALGAS E SARGASSUM	12
2.2. ATIVIDADE ANTIOXIDANTE	14
2.3. ATIVIDADE ANTIMICROBIANA	15
3. OBJETIVOS	18
3.1. OBJETIVO GERAL	18
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	18
4. MATERIAIS E MÉTODOS	19
4.1. COLETA	19
4.2. CARACTERIZAÇÃO DA ALGA	19
4.3. DESIDRATAÇÃO DAS MACROALGAS MARINHAS E PREPARAÇÃO DO EXTRATO	19
4.4. ENSAIO QUALITATIVO DO PERFIL FITOQUÍMICO DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO DE S. CYMOSUM	19
4.5. ENSAIO ANTIMICROBIANO	21
4.6. TESTES ANTIOXIDANTES	22
4.6.1. Determinação do teor de fenóis totais (TFT)	23
4.6.2. Determinação do teor de flavonoides totais (TFT)	23
4.6.3. Atividade antioxidante total	23
4.6.4. Capacidade de sequestro do radical ácido-2,2-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico) (ABTS)	24
4.6.5. Capacidade de sequestro do radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (DPPH)	24
4.6.6. Poder de redução dos íons férricos (FRAP)	25
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	26
5.1. ANÁLISE FITOQUÍMICA	26
5.2. ATIVIDADE ANTIOXIDANTE	27
5.3. ATIVIDADE ANTIBACTERIANA	29
6. CONCLUSÃO	31
REFERENCIAS	32

1. INTRODUÇÃO

As macroalgas são organismos multicelulares, autótrofos marinhos e estuarinos, sua classificação taxonômica é dividida em 3 grupos baseados na sua pigmentação: as Chlorophyta, são as algas verdes, as Rhodophyta, são as algas vermelhas, e as Phaeophyceae, são as algas marrons ou pardas (LEANDRO *et al.*, 2020). Esses organismos marinhos são responsáveis pela produção de metabólitos secundários altamente bioativos com potencial para utilização medicinal, terapêutica e no desenvolvimento de novos fármacos, dispendo de propriedades antivirais, antifúngicas, antimicrobianas, antioxidantes, anti-inflamatórias e antineoplásicas (IWAMOTO *et al.*, 2001; EL GAMAL, 2010; EL-BAROTY *et al.*, 2007; ABOU ZEID *et al.*, 2014).

Em relação aos metabólitos produzidos nas células, as espécies reativas de oxigênio (EROs), de nitrogênio (ERNs) e outras espécies reativas são formadas como consequência do funcionamento natural, tendo origem a partir do escape de elétrons do oxigênio molecular durante as reações de transporte de elétrons que ocorrem nos cloroplastos, mitocôndrias e membranas plasmáticas (VASCONCELOS *et al.*, 2013; SHARMA *et al.*, 2012). Outra maneira que contribui para formação de EROs é o estresse oxidativo, que é um desequilíbrio entre compostos pró-oxidantes e antioxidantes, quando ocorre um predomínio de oxidantes pode haver também o acúmulo de radicais livres. As consequências da abundância de radicais livres e de danos causados por eles podem estar relacionados ao desenvolvimento de doenças como diabetes tipo II, vários tipos de câncer e de doenças neurodegenerativas.

Assim, esses radicais livres podem causar prejuízos para as células, visto que são altamente reativos e propensos ao ataque em macromoléculas estruturais, como lipídios de membranas, DNA e proteínas. A fim de evitar a deterioração dessas moléculas, existe uma busca pela descoberta de compostos antioxidantes. As macroalgas são organismos ricos em compostos fenólicos, cujos possuem o grupo hidroxila (-OH) que reagem com os radicais livres, capturando-os e impedindo que causem os danos às células (LIM *et al.*, 2019, MAHENDRAN *et al.*, 2022). Para cada tipo de espécie reativa gerada pelo organismo e radical livre existe um antioxidante apropriado, assim, um composto antioxidante pode funcionar para um sistema, mas para outro não.

A atividade antioxidante já foi descrita anteriormente em diversas espécies de algas marinhas (BOONCHU *et al.*, 2011; FARASAT *et al.*, 2013). Nesse contexto, o gênero *Sargassum*, pertencente a classe de algas pardas Phaeophyceae, se apresenta como uma

potencial fonte de compostos antioxidantes, como estudado em *S. fulvevellum*, *S. hemiphyllum*, *S. thunbergii* e *S. micranthum*. (YENDE *et al.*, 2014). Esses compostos antioxidantes apresentam funções como defesa contra danos oxidativos e participação nas principais vias de sinalização celular, reduzindo os danos causados pelas espécies reativas de oxigênio. (DEVI *et al.*, 2011).

Além da atividade antioxidante há relatos da propriedade antibacteriana para algumas espécies de *Sargassum* (DI FILLIPO-HERRERA *et al.*, 2018; Batela *et al.*, 2017). *Sargassum latifolium* e *Sargassum glaucescens*, foram estudados e mostraram atividade antibacteriana e antifúngica promissora além da presença de diferentes grupos de metabólitos secundários como flavonóides, taninos, fenólicos, esteróides e terpenóides que são importantes indicadores das propriedades microbianas das algas marinhas (BALETA, *et al.*, 2017). Os grupos das bactérias selecionadas possuem interesse comercial por apresentarem algum tipo de resistência a antibióticos e já são amplamente utilizadas em estudos com a mesma finalidade.

As algas têm se tornado alvos interessantes por apresentarem baixo custo em pesquisa, grande potencial sinérgico e menor risco de efeito colateral. Particularmente a espécie de *Sargassum cymosum* é uma macro alga marrom que têm sido relatadas e poucos estudos têm explorando sua bioatividade, dessa forma, torna-se atrativo avaliar suas propriedades antioxidantes e antimicrobianas tendo em vista a crescente busca do mercado consumidor por produtos naturais, não agressores do meio ambiente e não tóxicos à saúde humana.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1. Macroalgas e *Sargassum*

Levando em consideração que 71% da superfície terrestre é composta por oceanos, a coleta de macroalgas em comunidades costeiras ao redor do mundo com diversas finalidades, como para alimentação, uso terapêutico, fertilizante e biocombustíveis, tem se tornado um comportamento crescente na sociedade (RAJAURIA; YUAN, 2021; COSTA *et al*, 2020, ROVER *et al*, 2015; MARTINEZ, 2015). No Brasil, atualmente existem 4 993 espécies de algas descritas no país, sendo que 4 972 destas espécies são nativas. No entanto, tal grupo só tem 1,8% de representação do patrimônio genético do país, demonstrando que ainda possui uma pequena parcela de contribuição para a flora brasileira (BAYMA *et al.*, 2022). Ainda sim esforços são direcionados para reverter tal situação,. A nível nacional Estado de Pernambuco é uma das principais regiões de estudo de ambiente recifal do Brasil, ficando para atrás apenas do Rio Grande do Norte, e também o segundo estado com maior número de publicações de pesquisa em macroalgas do Brasil(YENDE *et al.*, 2014, HARB; CHOW, 2022).

As macroalgas marinhas são organismos multicelulares, macroscópicos, eucarióticos e autótrofos. A organização taxonômica divide as macroalgas em três grupos baseado na cor do talo, sendo as algas verdes (Chlorophyta), as vermelhas (Rhodophyta) e as marrons ou pardas (Ochrophyta ou Phaeophyceae) (LEANDRO *et al*, 2020). As macroalgas são encontradas nas zonas costeiras intertidais e subtidais e nos habitats estuarinos. A vida nesses habitats pode ser um desafio, e os organismos que vivem neles podem experimentar uma variedade de estressores físicos: temperatura, luz, salinidade, dessecação e ação das ondas, ao lado de pressões biológicas: predação, competição, parasitismo e alelopatia (WAN, 2019).

Desta maneira, *Sargassum* (C. Agardh, 1820) desempenha importante papel nos ecossistemas de água do mar tropical que servem como fonte de alimento e abrigo. Em relação a relevância antrópica atua com destaque na culinária da cultura do leste asiático. Na taxonomia, o gênero *Sargassum* pertence às algas marrons da classe Phaeophyceae na ordem das Fucales (SANJEEWA *et al*, 2018). Além disso, o gênero é subdividido em quatro subgêneros baseado nas características do talo: *Phyllotrichia*, *Bactrophyucus*, *Arthrophyucus* e *Sargassum*. Para a resolução taxonômica dos subgêneros técnicas de marcadores moleculares são associados a morfologia, através do gene espaçador transcrito interno ITS-2 (GIRIWONO *et al*, 2019).

A espécie *Sargassum cymosum* é uma representante entre as 12 espécies de *Sargassum* spp. ocorrentes no Brasil. A distribuição geográfica nacional dela é a partir dos litorais do Ceará até o Rio Grande do Sul (Forzza *et al.*, 2010; Rover *et al.*, 2014). Além disso, a espécie é caracterizada morfológicamente pela organização em um eixo cilíndrico ereto e a fixação ao substrato por apressório rígido, coloração marrom a marrom-esverdeada do talo, com a ausência de flutuadores e com filóides com formato podendo variar de lanceoladas a linear-lanceolado, com denticções marginais irregulares e sendo os filóides distribuídos espiralmente no eixo cilíndrico, como visto na Figura 1. Em relação às características reprodutivas, podem haver indivíduos monoicos ou dioicos, com oogônios e anterídios localizados em conceptáculos individualizados (De Paula *et al.*, 1988).

Figura 1. Holótipo molhado de *Sargassum cymosum*



Fonte autoral.

Na composição química das algas, os metabólitos primários são os comuns que servem para o funcionamento essencial da alga, sendo eles lipídeos, proteínas e polissacarídeos, enquanto que os metabólitos secundários não são essenciais, mas conferem vantagens na adaptação do ambiente, sendo que os principais produzidos nos tecidos das algas

são os compostos fenólicos, compostos halogenados, esteróides, terpenos e pequenos peptídeos, entre outros (ROSA *et al.*, 2020, WAN *et al.*, 2019). Muitos compostos encontrados nas macroalgas ainda não são totalmente compreendidos (WAN *et al.*, 2019).

Das classes de compostos químicos ativos que possuem atividades ecológica e medicinal, gerando interesse econômico, os principais constituintes são compostos fenólicos, flavonoides, terpenos, alcalóides, esteroides, taninos, saponinas, cumarinas, quinonas e glicosídeos (Deyab *et al.*, 2016; Polo *et al.* 2015).

2.2. Atividade antioxidante

O pareamento de elétrons nada mais é do que dois elétrons ocupando o mesmo orbital em um átomo ou molécula, quando uma orbital possui apenas um elétron tal estrutura é chamada de radical livre. Os radicais livres são moléculas instáveis capazes de interagir com outras moléculas, porque perdeu um elétron da camada mais externa, fazendo com que sejam muito reativos. A formação de radicais podem ser produzidos no organismo como produtos do metabolismo celular ou fatores externos como exposição solar, bebida alcoólica e radiação, por exemplo. Por serem instáveis, o surgimento e o desaparecimento destas espécies reativas podem acontecer de maneira muito rápida, no entanto, se ocorrer a interação com outras moléculas, podem gerar um efeito em cadeia e gerarem novos radicais. O ataque dos radicais livres aos tecidos é conhecido como estresse oxidativo, sendo os radicais mais danosos para os organismos é o radical hidroxila e o radical superóxido (CHORILLI *et al.*, 2007; COTINGUIBA *et al.*, 2013)

Assim, pode-se dizer também que o estresse oxidativo é um desequilíbrio entre compostos pró-oxidantes e antioxidantes, em que o aumento do número de pró-oxidantes geram espécies reativas de oxigênio (ERO), nitrogênio (ERN), entre outras espécies. As EROs são produzidas por células do tecido e podem causar dano celular, visto que são propensos ao ataque em macromoléculas estruturais, como lipídios de membranas, DNA e proteínas (LIM *et al.*, 2019, MAHENDRAN *et al.*, 2022). Além disso, as ERO e ERN possuem função fisiológica na sinalização da apoptose, controle da pressão sanguínea, na fagocitose de agentes agressores e influência em órgãos reprodutivos animal e vegetal (VASCONCELOS *et al.*, 2007). O efeito deletério de tais reações podem ser vistos no desenvolvimento de doenças crônicas como diabetes tipo II, cânceres e doenças neurodegenerativas, por exemplo (LIM *et al.*, 2019). Os antioxidantes são uma defesa que protege as células contra os danos das ERO, podendo ser por via enzimática ou não enzimática (YENDE *et al.*, 2014).

Pela via enzimática um exemplo clássico é a catalase que reduz peróxido de hidrogênio (H_2O_2) em água (H_2O) e oxigênio (O_2). Enquanto que os não enzimáticos estão as vitaminas A, E e C, β -caroteno, por exemplo. As macroalgas são organismos ricos em compostos antioxidantes e o gênero *Sargassum* tem sido estudado como uma destas fontes. Em *S. fulvellum* os polissacarídeos sulfatados mostraram uma potente eliminação de radicais livres, já em *S. hemiphyllum* e *S. thunbergii* os altos níveis de compostos fenólicos foram os principais responsáveis pela atividade antioxidante e em *S. micranthum* foram as plastoquinonas (YENDE *et al.*, 2014).

2.3. Atividade antimicrobiana

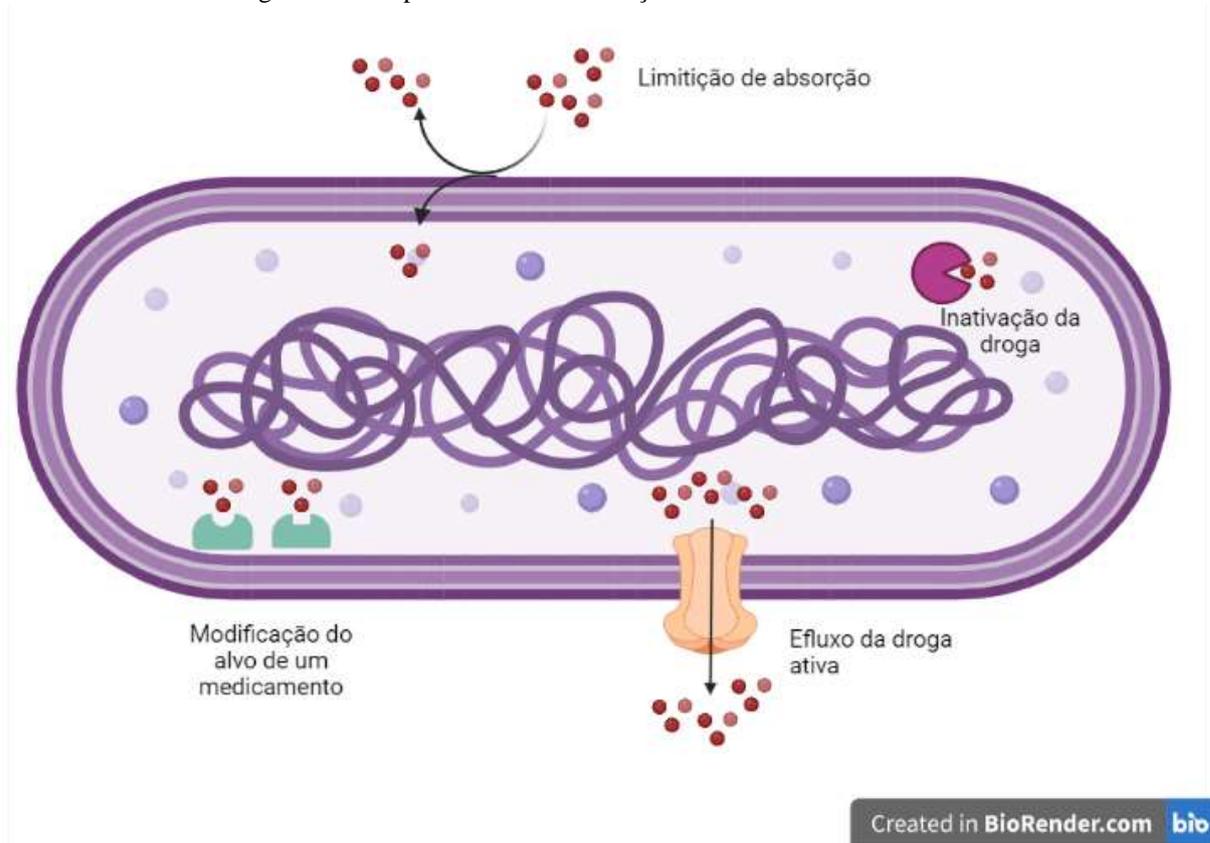
Um dos problemas atuais é resistência de micróbios a certos antibióticos, devido ao uso incorreto de drogas, evolução dos microrganismos, por exemplo, desenvolvendo, assim cepas muito resistentes e que não tem resposta a nenhum medicamento no mercado atual. Para contornar tal situação, estudos são dedicados para o entendimento dos mecanismos utilizados para reverter tal situação, sendo as principais categorias de mecanismo de resistência a antibióticos são: modificação do alvo de um medicamento, efluxo da droga ativa, limitação da absorção de um medicamento e inativação da droga, como visto na Figura 2 (Tenover, 2006; Liu *et al.*, 2020, BARBOSA *et al.*, 2022).

No mecanismo de ação de limitação da absorção do medicamento, o artifício utilizado é dificultar a entrada do antibiótico dentro da célula através da permeabilidade do antibiótico a parede celular e a membrana plasmática da bactéria, já que é através destas estruturas que ocorre a separação do exterior para o interior da célula. No mecanismo de inativação da droga, o procedimento ocorre através de enzimas que são capazes de degradar um grupo químico ou alguma estrutura que torna o antibiótico um composto ativo. Já na modificação do alvo de um medicamento, o receptor que interage com o antibiótico sofre alteração, assim, não sendo mais possível fazer a interação molécula-receptora. E o efluxo da droga é o meio que através de bombas, a bactéria consegue carregar para fora da célula, moléculas do antibiótico (TORTORA *et al.*, 2010).

Além disso, devido às diferenças na estrutura celular entre Gram negativas e Gram positivas existe uma variação nos tipos de mecanismos utilizados. As gram positivas tem uma limitação no uso de mecanismos, como podendo ter menos controle em relação à absorção das drogas e não tendo capacidade para efluxo em alguns casos, as gram negativas geralmente podem utilizar os quatro mecanismos sem nenhuma restrição (Deak *et al.*, 2016, BARBOSA

et al., 2022). Existem estratégias que pacientes e profissionais da saúde podem adotar para prevenir o desenvolvimento de resistência a antibióticos, como utilização da droga até o fim do tratamento, não só até os sintomas desaparecerem e evitar prescrições desnecessárias e dosagens erradas dos medicamentos (TORTORA *et al.*, 2010)

Figura 2. Principais mecanismos de ação de resistência a antibióticos



Os antibióticos são representados pelas moléculas vermelhas e a bactéria representada como modelo é Gram negativa. Fonte autoral.

Pseudomonas aeruginosa é uma bactéria gram negativa com resistência inerente já que tem como mecanismos presentes a impermeabilidade e o efluxo de antibióticos (HENWOOD *et al.*, 2001). Em consequência disso, o monitoramento da suscetibilidade e dos padrões clínicos para a orientação adequada e direcionamento de novos agentes antimicrobianos são fundamentais para guiar uma escolha empírica ou terapia direcionada (PATHMANATHAN *et al.*, 2009). Os hospitais brasileiros já sofreram uma crescente prevalência deste vírus com resistência a antibióticos, devido a disseminação de clones e prescrição incorreta de medicamentos, sendo um grave problema de saúde pública no país (ANDRADE *et al.*, 2003).

Klebsiella pneumoniae é uma bactéria gram negativa responsável por originar doenças como pneumonia, infecções no sistema urinário e respiratório, sepse e outras doenças (GUO

et al., 2016; MARTIN *et al.*, 2016). Tal bactéria é causadora de um número significativo de quadros de morbidade e mortalidade, sendo um importante patógeno de infecções nosocomiais nos Estados Unidos e na Índia (SIKARWAR; BATRA, 2011). As diversas cepas resistentes a antibióticos se tornam um problema cada vez mais significativo ao redor do mundo, porque cepas como de *K. pneumoniae* carbapenemases (KPC), não são detectados em exames de rotina, possuindo assim um maior risco de disseminação (ARNOLD *et al.*, 2011).

A bactéria *Staphylococcus aureus* é uma bactéria gram positiva, foi a primeira bactéria que se detectou o desenvolvimento de resistência ao tratamento de antibióticos, devido a codificação do gene β -lactamase codificada por plasmídeo. Tal grupo de bactéria resistente é conhecido como MRSA (sigla em inglês para *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus*, em português **Staphylococcus aureus resistentes a meticilina**) (TORTORA *et al.*, 2010). Em virtude da alta capacidade de virulência, da diversidade de infecções com risco de vida e a adaptação em diferentes condições ambientais, *S. aureus* é um patógeno de grande preocupação (LOWY *et al.*, 2003).

A *Escherichia coli* é uma bactéria gram negativa encontrada no trato intestinal de animais, fazendo parte da microbiota intestinal, desempenhando um relevante papel fisiológico, como a produção de vitaminas K e B, e não sendo patogênica nos organismos que habita em condições ambientais salubres (SOUZA *et al.*, 2016). Por ser uma espécie associada com fezes de animais de sangue quente, estudos a retratam como referência para obter o controle de qualidade da água e em ambientes de condições de desequilíbrio, como em imunodeprimidos, que podem ser a maior causadora de doenças entéricas, sendo a raiz de um prejuízo gerado pela não absorção dos nutrientes necessários e causando fraqueza nos indivíduos (MURRAY, 1999). Outros fatores positivos que podem ser destacados para a escolha desta espécie como organismo modelo de estudo: seu rápido crescimento e a capacidade de obtenção de energia a partir de diversas fontes, fornecendo rapidez e baixo custo aos testes.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Avaliar a partir do extrato bruto hidroalcoólico de *Sargassum cymosum* as atividades antioxidante e antimicrobiana.

3.2. Objetivos específicos

- Identificar a espécie e preparar o extrato hidroalcoólico de *Sargassum* bruto utilizando o método convencional de extração por solventes.
- Realizar um screening fitoquímico de 10 classes de constituintes presentes no extrato hidroalcoólico.
- Avaliar a atividade antibacteriana por meio de um teste bacteriostático e um bactericida que investigam diferentes concentrações.
- Avaliar a atividade antioxidante do extrato bruto hidroalcoólico de *Sargassum* através de seis métodos espectrofotométricos.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Coleta

A coleta foi realizada no dia 21 de dezembro de 2021 na Praia de Enseada dos Corais (S 008° 19' 4.4" e W 34° 56' 53.3"), localizada no município do Cabo de Santo Agostinho em Pernambuco, Brasil, com cerca de três quilômetros de extensão. A escolha do lugar foi determinada pela grande diversidade de macroalgas presentes.

4.2. Caracterização da alga

O material ficológico foi fixado em solução de formol 4% em água do mar para posterior identificação em lâminas semipermanentes. Foram observados o padrão e a disposição dos filoides e receptáculos quando necessário com o auxílio do microscópio estereoscópio (Zeiss, GSZ) e do microscópio óptico (Olympus, CX21FS1). A identificação foi realizada através de literaturas específicas para o estado de Pernambuco e em parceria com o Laboratório de Bentos do Departamento de Oceanografia da UFPE.

4.3. Desidratação das macroalgas marinhas e preparação do extrato

Em laboratório, as biomassas coletadas foram lavadas com água corrente para remoção de sujeiras macroscópicas e colocadas para secagem em estufa (Quimis, modelo Q314M242) com circulação e renovação de ar a 36 °C por 48 horas. As macroalgas secas foram trituradas com o auxílio de um moedor doméstico, obtendo-se uma massa homogênea.

Foi preparado um extrato a 10% (p/v) utilizando etanol: o hidroalcoólico, 70% sendo a proporção de etanol e completada com água Milli-Q (Direct-Q 8 UV Millipore). Posteriormente a preparação da mistura, o material foi colocado em sonicador ultrassônico (EASY 10 H) por 30 minutos por 3 vezes. E, então, logo após foi realizada uma filtração a vácuo utilizando papel filtro de café, além do auxílio do funil de Büchner e de Kitassato. Em seguida, o material foi colocado em evaporador rotativo (Rotovapor R-114) para remoção completa do etanol, sendo obtida uma solução líquida. O extrato preparado foi congelado a -20°C e, por fim, liofilizado.

4.4. Ensaio qualitativo do perfil fitoquímico do extrato hidroalcoólico de *S. cymosum*

O screening fitoquímico foi baseado no método Deyab, Elkatony e Ward (2016) com algumas adaptações. O extrato liofilizado foi diluído em 18 mL de solução de extrato na concentração de 1 mg/mL em solvente etanólico (70%). Esse ensaio foi realizado a fim de identificar os principais grupos químicos naturais, que estão presentes ou ausentes no extrato,

tais como alcalóides, terpenóides, esteróides, taninos, saponinas, flavonóides, fenóis, cumarinas, quinonas e glicosídeos.

Desenho experimental

- Alcalóides: foram colocados 2 mL de ácido clorídrico e mais 2 mL de solução do extrato. A solução ficando esverdeada ou formação de um precipitado indica a presença de alcalóides.
- Terpenóides: foram colocados 2 mL de clorofórmio concentrado com ácido sulfúrico mais 0,5 mL de solução do extrato. A presença de uma interface marrom ou avermelhada indica a existência de terpenóides.
- Esteróides: foram colocados 2 mL de clorofórmio, mais 1 mL de ácido sulfúrico e mais 0,5 mL solução do extrato. A presença de uma interface marrom ou avermelhada indica a existência de esteróides.
- Taninos: foram colocados 1mL de cloreto férrico e mais 2 mL de solução do extrato. A solução ficando esverdeada escuro ou azulada escuro indica a presença de taninos.
- Saponinas: foram colocados 2 mL de água destilada e mais 2 mL de solução do extrato. A formação de uma espuma com 1 cm de altura indica a presença de saponinas.
- Flavonoides: foram colocados 2 mL de hidróxido de sódio 2N e mais 2 mL de solução do extrato. A solução ficando amarelada indica a presença de flavonoides.
- Fenóis: foram colocados 2 mL de água destilada com um pouco de cloreto de ferro 10% e mais 2 mL de solução do extrato. A solução ficando esverdeada ou azulada indica a presença de fenóis.
- Cumarinas: foram colocados 1 mL de solução de hidróxido de sódio 10% e mais 1 mL de solução do extrato. A solução ficando amarelada indica a presença de cumarinas.
- Quinonas: foram colocados 1 mL de ácido sulfúrico e mais 1 mL de solução do extrato. A solução ficando avermelhada indica a presença de quinonas.
- Glicosídeos: foram colocados 3 mL de clorofórmio e solução de amônio 10% e mais 2 mL de solução do extrato. A solução ficando rosa indica a presença de glicosídeos.
- Para o teste de cada grupo químico foi feito seu respectivo controle negativo, que no local do volume da solução do extrato foi colocado o volume do solvente da solução (solução hidroalcoólica 70% etanol) para a validação de que reação ocorria entre as algas e os reagentes.

O ensaio foi realizado em parceria com o Laboratório Química de Produtos Naturais do departamento de Antibióticos e Laboratório de Bentos do departamento de Oceanografia da UFPE.

4.5. Ensaio antimicrobiano

Para o ensaio microbiológico, foram utilizadas as cepas das bactérias *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* e *Klebsiella Pneumoniae*. As cepas de foram ativadas diretamente na placa de ágar Mueller Hinton. Em seguida foi incubada a 37°C por 24 horas.

O ensaio para determinar a Concentração Mínima Inibitória (CMI) do composto bioativo da amostra foi realizado em triplicata, através de métodos de microdiluição em caldo Mueller Hinton (MH), para detectar possíveis atividades antimicrobianas do composto. As placas foram incubadas a 37 °C por 24 h, após o término da incubação, é desejado obter a mais baixa concentração que apresentou atividade, ou seja, a que não apresentou crescimento bacteriano, foi considerada como a CMI (CLSI, 2011). Inicialmente foi preparada uma suspensão com solução salina (concentração de células $1,5 \times 10^8$) em espectrofotômetro a 600 nm para bactérias até obter uma absorbância entre 0,08 a 0,13. A suspensão obtida foi diluída de modo a se obter uma suspensão bacteriana com a concentração de células $1,5 \times 10^6$. Esta foi à suspensão que foi adicionada em cada poço.

Foram adicionados 180 µL de meio de cultura no quarto poço com a solução mãe e 100 µL nos demais poços que foi realizada a diluição, reservando os três primeiros poços para os controles. Em seguida foram adicionados 10 µL da amostra na concentração inicial de 1.000 µg/mL apenas no quarto poço (sol. Mãe), e realizada a diluição seriada pela transferência de 100 µL da solução da solução mãe para o poço seguinte e esse procedimento foi repetido, sucessivamente até o último poço, os últimos 100 µL restantes foram descartados. Além disso, foi feito o controle positivo com 100 µL de meio de cultura Mueller Hinton com mais 10 µL de microrganismo testado. O controle do solvente foi composto por 90 µL de meio de cultura com mais 10 µL de solvente mais 10 µL do microrganismo testado.

O ensaio foi realizado em parceria com o Laboratório Produtos Naturais do Departamento de Bioquímica da UFPE.

4.6. Testes antioxidantes

A atividade antioxidante *in vitro* do extrato bruto hidroalcoólico de *S. cymosum* foi avaliada por seis ensaios colorimétricos. Na tabela 1 a seguir estão apresentados os parâmetros dos controles positivos correspondentes aos testes de DPPH, FRAP, Folin-Ciocalteu, TFT e ABTS.

Tabela 1. Sumário dos parâmetros das respectivas curvas padrões para os diferentes ensaios antioxidantes, especificando faixa de concentração do padrão ($\mu\text{g.mL}^{-1}$), equação da reta ($y = ax + b$) e do coeficiente de regressão (R^2)

	Ácido ascórbico	Ácido tânico	Ácido gálico	Trolox
DPPH	1,95 - 31,25 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ $y = 2256,7x + 3,7334$ $R^2 = 0,9953$			
FRAP	3,9 - 62,5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ $y = 763,41x + 29,338$ $R^2 = 0,9397$			
Folin-Ciocalteu		1,95 - 1000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ $y = 4,0685x + 0,155$ $R^2 = 0,9839$		
TFT			1,95 - 125 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ $y = 20,35x + 0,0499$ $R^2 = 0,9989$	
ABTS				12,5 - 500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ $y = 0,1579x + 14,811$ $R^2 = 0,8391$

Fonte autoral.

4.6.1. *Determinação do teor de fenóis totais (TFT)*

A quantificação do teor de taninos totais foi baseada na metodologia de Singleton, Rossi (1965), descrito por Ainsworth, Gillespie (2007) e Agbor, Vinson, Donnelly (2014) adaptado, na qual partiu-se de 500 μL do extrato hidroalcoólico a 1 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$. Cada amostra foi diluída com a adição de 500 μL de amostra seguida da adição de 500 μL de Folin (1:1 v/v) e agitação vigorosa. Após um repouso de 3 minutos, foi adicionado aos tubos contendo as amostras com o Folin, bicarbonato de sódio a 8%. Manteve-se novamente em repouso por 2 horas e logo após, os tubos foram submetidos a centrifugação a 2000 rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi retirado 300 μL para leitura da placa de 96 poços em 725 nm. Todas as análises foram feitas em triplicatas.

O ácido tânico foi utilizado como padrão e os resultados foram calculados com base na curva de calibração (1,98 – 1000 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) e expressos em mg equivalente de ácido Tânico por grama de extrato (mg TAE/g extrato).

4.6.2. *Determinação do teor de flavonoides totais (TFT)*

A quantificação do teor de flavonoides totais (TFT) foi baseada nos métodos de Miguel, (MIGUEL *et al.*, 2014) em microplacas de poliestireno de 96 poços foram adicionados 100 μL dos extratos hidroalcoólicos a 1 mg/mL e 100 μL de cloreto de alumínio (206911 Aldrich) a 2%. Depois de 1 h de incubação à temperatura ambiente e no escuro, as absorbâncias foram lidas em 425 nm no leitor de Elisa (Multiskan Skyhigh). Um branco foi preparado com 100 μL de solvente hidroalcoólico, em vez do extrato. A análise foi feita em triplicata.

Os resultados de TFT dos extratos serão apresentados como média \pm desvio padrão e expressos em miligramas de equivalentes de quercetina (mg EQ) por grama (g) do extrato, tendo em vista a curva padrão da quercetina (33.795-1, Aldrich), nas concentrações de 10 a 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

4.6.3. *Atividade antioxidante total*

O teste de antioxidante do fosfomolibdênio foi realizado de acordo com Popović-Djordjević *et al.* (2019), com algumas modificações. A atividade ocorre pela redução do complexo fosfomolibdênio, que é formado a partir de um reativo constituindo de fosfato de sódio (28 mM), molibdato de amônio (4 mM) e ácido sulfúrico (600 mM).

Para cada reação, foram adicionados 1000 µL e 100 µL das amostras em microtubos (em triplicata por concentração). Em seguida, foram incubados em banho-maria por 90 minutos a 95°C. Subsequentemente, 200 µL foram aplicados em placas de 96 poços onde foi realizada a leitura no espectrofotômetro em 695 nm.

4.6.4. Capacidade de sequestro do radical ácido-2,2-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico) (ABTS)

O teste ABTS foi realizado segundo Rasera et al. (2019) com algumas adaptações, com o objetivo de estabilizar o radical ácido-2,2-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico) (ABTS), mediante a mudança de coloração da solução do verde para o transparente.

Primeiramente, foi realizada a diluição do material teste e da solução etanólica de ABTS adaptada para o experimento. A partir de uma solução-mãe contendo 7 mM de ABTS e de 140 µM de persulfato de potássio, uma solução mais diluída foi preparada, em que para cada 1 mL de solução-mãe eram adicionados 33 mL de etanol, tendo o ajuste da substância em 700 nm. A reação ocorreu adicionando 20 µL da amostra mais 220 µL de ABTS. Após 6 minutos de reação foi observada a mudança de coloração. A leitura foi feita em 734 nm em espectrofotômetro de microplaca. O controle negativo foi preparado colocando no local da amostra 20 µL de etanol e tratado de forma idêntica.

A capacidade de sequestro do radical do ABTS dos extratos e do controle positivo expressa em porcentagem, foi calculada pela Equação da reta de ABTS (%) e será apresentada como média ± desvio padrão.

$$ABTS (\%) = \frac{Abs_{Controle\ negativo} - Abs_{Amostra}}{Abs_{Controle\ negativo}} \times 100$$

4.6.5. Capacidade de sequestro do radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (DPPH)

A capacidade de sequestro de radical DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazila) foi determinada de acordo com Blois (1958) e descrita por Duan e colaboradores (2006) e Kato *et al.* (2016), com algumas modificações em microplacas de poliestireno de 96 poços.

O ensaio para determinar a capacidade de sequestro de radical DPPH do composto bioativo da amostra foi realizado em triplicata. Foram adicionados 40 µL do extrato, diluído em 8 séries sendo a concentração inicial 1 mg/mL, e 250 µL de DPPH diluído em etanol na

concentração em 50 µg/mL. O L-ácido ascórbico foi utilizado como controle positivo diluído em etanol e feita uma diluição seriada com 10 séries, sendo a concentração inicial 500 µg/mL. No controle negativo foi adicionado 150 µL de DPPH e no branco da amostra 150 µL do extrato. Após a preparação dos poços, a placa foi incubada em temperatura ambiente e no escuro por 30 minutos. As absorbâncias foram monitoradas a 517 nm no leitor de Elisa (Multiskan Skyhigh).

A capacidade de sequestro do radical do DPPH dos extratos e do controle positivo expressa em porcentagem foi calculada pela Equação da reta de DPPH (%) e será apresentada como média \pm desvio padrão.

$$DPPH (\%) = \frac{Abs_{Controle\ negativo} - Abs_{Amostra}}{Abs_{Controle\ negativo}} \times 100$$

4.6.6. Poder de redução dos íons férricos (FRAP)

O poder de redução de íons férricos (FRAP) foi determinado de acordo com a metodologia descrita por Khatua, Roy, Acharya (2013). Aos tubos contendo 500 µL do extrato na concentração 1 mg/mL foi adicionado 1,25 mL de tampão fosfato a 0,2 M (pH 6,6) e 1,25 mL de ferricianeto de potássio a 1%, os quais foram mantidos em banho maria por 20 minutos a 50°C. Após a incubação e resfriamento dos tubos, a reação foi interrompida pela adição de 1,25 mL de ácido tricloroacético (TCA) a 10%. Os tubos foram centrifugados e 2 mL da camada superior da mistura reacional foram retirados e misturados com 2 mL de água destilada e 0,4 mL de cloreto férrico a 0,1%. Os tubos foram incubados por 10 minutos em temperatura ambiente. Depois disso, as absorbâncias foram monitoradas a 700 nm (Multiskan Skyhigh).

O controle positivo foi o butil hidroxianisol (BHA), foi feita uma diluição seriada com 10 séries, sendo a concentração inicial 1 mg/mL, e tratado de forma idêntica. O branco foi feito nas mesmas proporções, mas no lugar do extrato foi colocado o solvente hidroalcoólico. Os resultados do FRAP foram apresentados pela Equação da reta de FRAP (%) e será apresentada como média \pm desvio padrão.

$$FRAP (\%) = \frac{Abs_{Amostra} - Abs_{Controle\ negativo}}{Abs_{Amostra}} \times 100$$

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Análise fitoquímica

O resultado da análise fitoquímica qualitativa do extrato hidroalcoólico de *Sargassum cymosum* mostrou a presença de alcalóides, terpenos, esteroides, saponinas, flavonoides, cumarinas e quinonas, como demonstrado na Tabela 2 a seguir. A fim de entender se os constituintes do gênero teriam muita variação, foi feita uma comparação com outros extratos brutos de solventes aquosos ou diluídos em algum tipo de álcool, seja metanol ou etanol, de cinco espécies do gênero, visto que o solvente é um importante fator em relação aos constituintes extraídos (ROSALINE *et al.*, 2012).

Foi evidenciado que perfil fitoquímico da espécie em estudo é muito semelhante com outras espécies já relatadas na literatura do mesmo gênero, tais como *S. oligocystum*, *S. crassifolium*, *S. muticum*, *S. wightii* e *S. swartzii*, apresentando ausência apenas de taninos, fenóis e glicosídeos.

Tabela 2. Comparação de constituintes presentes no extrato bruto em seis espécies de *Sargassum*

Constituintes	Expressão obtida <i>S. cymosum</i>	<i>S. oligocystum</i> (Baleta <i>et al.</i> , 2017)	<i>S. crassifolium</i> (Baleta <i>et al.</i> , 2017)	<i>S. muticum</i> (Moorthi e Balasubramanian, 2015)	<i>S. wightii</i> (Sangeetha <i>et al.</i> , 2017)	<i>S. swartzii</i> (Sujatha <i>et al.</i> , 2019)
Alcalóides	+			+	-	-
Terpenos	+	-	+		+	+
Esteróides	+	+	-	+	+	+
Taninos	-	+	+	+	+	+
Saponinas	+	+	+	-	+	+
Flavonóides	+	+	+	+	+	+
Fenóis	-	+	+		-	+
Cumarinas	+			+	-	+
Quinonas	+				-	-

Glicosídeos	-				-	+
-------------	---	--	--	--	---	---

Nota: +, Presença; -, Ausência. As células coloridas significam que não havia resultado equivalente no estudo, ausência de dados. Fonte autoral.

De maneira geral, o gênero *Sargassum* é muito conhecido pela riqueza de fenóis, no entanto, no extrato deste estudo não foi possível identificar a presença de fenóis e na literatura é possível encontrar outro extrato também que não apresentou na composição os fenol na amostra, não foi encontrada uma possível causa para tal acontecimento (RAJIVGANDHI *et al*, 2021; MILLEDGE *et al*, 2019; ANAELE *et al*, 2013; HEO *et al.*, 2005). Sendo os fenóis um importante composto orgânico tal ausência pode influenciar nas propriedades bioativas do extrato.

Os flavonoides são produtos do metabolismo vegetal, que possui atividade antioxidante e antimutagênica, sendo um composto muito explorado pela indústria farmacêutica e alimentícia (RAFFA *et al*, 2017, PETERSON; DWYER, 1998). Dos dez constituintes analisados, o único que apareceu em todas as espécies e solventes foi flavonoides, demonstrando que tal constituinte é abundante e tem menos sensibilidade à perda na extração.

5.2. Atividade antioxidante

No resultado observado para a quantificação de fenóis não foi possível observar uma concentração expressiva significativa na amostra. Confirmado pelo teste feito do screening fitoquímico, já discutido anteriormente. Em geral, os extratos de macroalgas são vistos como uma rica fonte de compostos fenólicos (HEO *et al.*, 2005). No entanto, o conteúdo fenólico varia entre as espécies e também aos fatores ambientais e fisiológicos, como tempo de vida, estágio reprodutivo, exposição ao sol, profundidade e salinidade (POLO e CHOW, 2022).

No estudo feito por ARIAS-ECHEVERRI *et al.* (2022) com a mesma alga em extrato etanólico confirma a presença de compostos fenólicos no extrato, quantificando 822 µg equivalente de ácido gálico /mL. Visto que o solvente influencia na relação de constituintes extraídos (ROSALINE *et al.*, 2012), apesar de ter ocorrido a presença de fenóis neste estudo, a concentração ainda assim é muito pequena. Como no extrato hidroalcoólico a composição percentual de etanol é reduzida em comparação com o etanol puro, provavelmente tal redução tenha influência na extração de compostos fenólicos da macroalga.

Na quantificação de flavonoides, a concentração encontrada foi de $27 \pm 0,46$ μg equivalente de quercetina/mL. Não sendo possível correlacionar o valor da concentração da amostra com outros estudos da mesma espécie. O estudo feito por Baek e colaboradores (2021) com 11 espécies de *Sargassum* preparadas em extrato hidroalcoólico 70% e diluídas em metanol, encontrou como maior concentração entre os extratos $82,33 \pm 3,24$ μg equivalente de quercetina/mL em *S. miyabei* Yendo e a menor concentração foi $22,08 \pm 1,32$ μg equivalente de quercetina/mL em *S. macrocarpum* e $22,08 \pm 0,65$ μg equivalente de quercetina/mL em *S. coreanum*. Assim, pode-se entender que existe uma baixa concentração de flavonóides em *S. cymosum*.

Nos testes de DPPH e fosfomolibdênio os controles positivos apresentaram valores de IC50 de 205 $\mu\text{g}/\text{mL}$ e 230,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$, respectivamente. Para a espécie de *Sargassum* em estudo foi verificado que não apresentou atividade antioxidante, não sendo possível calcular o IC50 para a amostra. No estudo feito por Lim *et al* (2018) em extrato etanólico de *S. serratifolium* houve resposta positiva para antioxidante no teste de DPPH, tendo um IC50 de $38,1 \pm 0,72$ $\mu\text{g}/\text{mL}$.

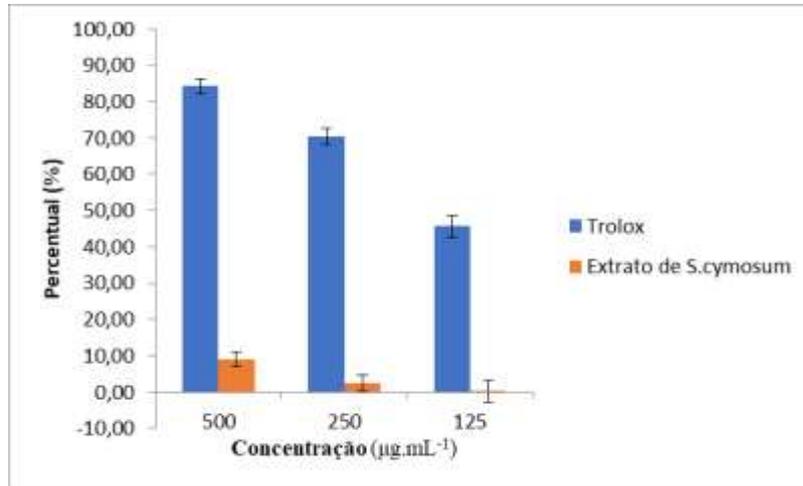
O FRAP apresentou ação antioxidante baixa quando comparada com o equivalente da mesma concentração do controle positivo de 1 000 $\mu\text{g}/\text{mL}$, ácido ascórbico com percentual de atividade $16,78 \pm 6,1\%$. O IC50 do controle positivo foi de 270 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

O ABTS foi possível observar a atividade antioxidante com um IC50 da amostra igual a 2762,17 $\mu\text{g}/\text{mL}$ e o controle positivo, o Trolox, teve um IC50 de 222,85 $\mu\text{g}/\text{mL}$, o que demonstra um valor de IC50 muito alto para uso em aplicação farmacêutica, devido a isso apresenta pouco valor comercial por ser necessário uma concentração muito alta de amostra para alcançar a metade da atividade máxima. No estudo feito por Lim e colaboradores com extrato etanólico de *S. serratifolium* (2019), o IC50 para ABTS foi de 50,2 $\mu\text{g}/\text{mL}$, demonstrando que realmente o IC50 encontrado para amostra do estudo teve um valor muito alto.

A comparação entre percentuais da amostra e do controle nas concentrações de 500; 250; 125 $\mu\text{g}/\text{mL}$, demonstra baixo percentual de sequestro radical ABTS mesmo em alta concentração quando comparado com o Trolox, como visto no Gráfico 1. Na concentração de 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$, o percentual de sequestro para a amostra é de $7,5 \pm 1,99\%$, enquanto que no controle o equivalente da concentração de Trolox deu $84,22 \pm 7,49\%$, para 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$, com $2,34 \pm 2,21\%$ para a amostra e $70,47 \pm 3,61\%$ para o controle, em 125 $\mu\text{g}/\text{mL}$ foi de $0,23 \pm$

2,98% para $45,63 \pm 1,61\%$ de Trolox. Deste modo, pode-se dizer que a partir de $125 \mu\text{g/mL}$ a captura ocorre em tão baixo que já não é mais significativamente interessante ocorrer captura do radical em concentrações mais baixas.

Gráfico 1. Comparação entre percentual de atividade do Trolox e de Sargassum Cymosum



Fonte autoral.

5.3. Atividade antibacteriana

O resultado observado da avaliação inicial da concentração mínima inibitória (CMI) para as bactérias testadas na amostra indicou crescimento bacteriano em todas as concentrações testadas. Mostrando que não houve inibição no crescimento bacteriano mesmo na concentração $1000 \mu\text{g mL}^{-1}$. Este resultado também foi confirmado pelo ensaio de concentração mínima bactericida (CMB), as altas concentrações de biomassa bacteriana indicam resultados com inibição insignificantes para as bactérias testadas no extrato hidroalcoólico de *S. cymosum*.

Resultado semelhante foi obtido no estudo de Puspita e colaboradores (2017), com uma outra espécie do mesmo gênero, *S. muticum* feita em extrato aquoso enzimático e outro aquoso, utilizando as espécies de bactéria *E. coli* e *P. aeruginosa*. Não foi obtida atividade inibitória antibacteriana, sendo atribuída possível presença de polissacarídeos no extrato bruto, fazendo com que houvesse um crescimento da população bacteriana ao invés da supressão.

Por outro lado, estudo feito por Di Fillipo-Herrera e colaboradores (2018), no extrato etanólico de *S. horridum* apresentou atividade antimicrobiana ao longo de todos os meses do ano. No entanto, a intensidade da atividade poderia variar nas espécies de acordo com o mês,

como aconteceu mais vigorosamente com *S. aureus* em julho. Ainda neste estudo, a caracterização química evidenciou um alto percentual de carboidratos na composição da espécie e mesmo variando ao longo dos meses, o percentual não representava menos de 40% da composição química do extrato.

No estudo feito por Moorthi e Balasubramanian (2015) com *S. muticum* no extrato metanólico não foi apresentado inibição de crescimento para *S. aureus*, mas apresentou atividade inibitória para *K. pneumoniae* mesmo em baixa concentração. Assim, como o trabalho de Rosaline *et al.* (2012) em que o extrato metanólico não apresenta uma atividade inibitória muito baixa com *S. wightii* para todas as espécies testadas no estudo. Estes estudos evidenciaram que solventes menos polares têm uma atividade antimicrobiana mais intensa quando comparada com solventes mais polares.

No trabalho de Batela *et al* (2017) foram feitos extratos etanólicos com as espécies *S. crassifolium* e *S. oligocystum*, os extratos apresentaram atividade antimicrobiana em 6 bactérias, tendo uma forte inibição com *E. coli*. Os compostos presentes nos extratos, como fenóis e esteroides, foram atribuídos como possíveis responsáveis pela presença da atividade antimicrobiana, por atuarem na parede celular bacteriana (MIRSHA, 2017, REGUANT *et al.*, 2000, EPAND *et al.*, 2007).

6. CONCLUSÃO

O extrato bruto hidroalcoólico apresentou compostos bioativos caracterizando o perfil fitoquímico mediante ao teste qualitativo, a presença de alcalóides, terpenos, esteróides, saponinas, flavonóides, cumarinas e quinonas. No entanto, mesmo demonstrando um perfil químico semelhante a outras espécies do gênero, não mostrou atividade antibacteriana frente ao organismos testados, como *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*. Os testes de atividade antioxidante, apenas o poder redutor de íons férricos (FRAP), quantificação de flavonoides e o sequestro de radicais de ABTS, foram positivos mas com baixo percentual para o FRAP e ABTS, uma quantificação baixa para flavonóides e IC50 muito alto para o ABTS. O que sugere que outras abordagens para o estudo desta alga devem ser elucidados uma vez que não foram exploradas neste trabalho, atividade antitumoral, antiviral, utilização como fertilizante, síntese de biocombustíveis, entre outras aplicações para a melhor compreensão e aplicação biotecnológica da espécie.

REFERÊNCIAS

- ABOU ZEID, A. H. *et al.* Water soluble polysaccharides extracted from *Pterocladia capillacea* and *Dictyopteris membranacea* and their biological activities. **Carbohydrate polymers**, v. 113, p. 62-66, 2014.
- AGBOR, Gabriel A.; VINSON, Joe A.; DONNELLY, Patrick E. International Journal of Food Science, Nutrition and Dietetics (IJFS) ISSN 2326-3350. 2014.
- AINSWORTH, Elizabeth A.; GILLESPIE, Kelly M. Estimation of total phenolic content and other oxidation substrates in plant tissues using Folin–Ciocalteu reagent. **Nature protocols**, v. 2, n. 4, p. 875-877, 2007.
- ANAËLLE, Tanniou *et al.* Green improved processes to extract bioactive phenolic compounds from brown macroalgae using *Sargassum muticum* as model. **Talanta**, v. 104, p. 44-52, 2013.
- ANDRADE, Soraya S. *et al.* Increasing prevalence of antimicrobial resistance among *Pseudomonas aeruginosa* isolates in Latin American medical centres: 5 year report of the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (1997–2001). **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 52, n. 1, p. 140-141, 2003.
- ARIAS-ECHEVERRI, Juan Pablo *et al.* Present and Future of Seaweed Cultivation and Its Applications in Colombia. **Journal of Marine Science and Engineering**, v. 10, n. 2, p. 243, 2022.
- ARNOLD, Ryan S. *et al.* Emergence of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC)-producing bacteria. **Southern medical journal**, v. 104, n. 1, p. 40, 2011.
- BAEK, Su Hyeon *et al.* The comparison of total phenolics, total antioxidant, and anti-tyrosinase activities of Korean *Sargassum* species. **Journal of Food Quality**, v. 2021, 2021.
- BALETA, Francis N. *et al.* Phytochemicals screening and antimicrobial properties of *Sargassum oligocystum* and *Sargassum crassifolium* Extracts. **Journal of Medicinal Plants**, v. 5, n. 1, p. 382-387, 2017.
- BARBOSA, Edinelson de Sousa *et al.* Prevalência e perfil de resistência da *Escherichia coli* isolada de infecções do trato urinário. **Research, Society and Development**, v. 11, n. 1, p. e0611124280-e0611124280, 2022.

BAYMA, A. P. et al. Biodiversidade. 2022.

BLOIS, Marsden S. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. **Nature**, v. 181, n. 4617, p. 1199-1200, 1958.

BOONCHUM, Walailuck *et al.* Antioxidant activity of some seaweed from the Gulf of Thailand. **International Journal of Agriculture and Biology**, v. 13, n. 1, 2011.

CALADO, Janaina Freitas; MOREIRA, Ana Luísa Piresc; MENDES, Liana de Figueiredo. O que sabemos sobre os impactos ambientais do turismo nos recifes tropicais do Brasil?. **Revista Brasileira de Pesquisa em Turismo**, v. 16, 2022.

CHORILLI, Marlus; LEONARDI, Gislaine Ricci; SALGADO, Hérica Regina Nunes. Radicais livres e antioxidantes: conceitos fundamentais para aplicação em formulações farmacêuticas e cosméticas. **Rev Bras Farm**, v. 88, n. 3, p. 113-8, 2007.

COSTA, L. H. et al. Green synthesis of gold nanoparticles obtained from algae sargassum cymosum: optimization, characterization and stability. **BioNanoScience**, v. 10, n. 4, p. 1049-1062, 2020.

COTINGUIBA, George Gomes et al. Método de avaliação da defesa antioxidante: uma revisão de literatura. **Journal of Health Sciences**, v. 15, n. 3, 2013.

DE PAULA, ÉDISON JOSÉ. O gênero *Sargassum* C. Ag.(Phaeophyta-Fucales) no litoral do Estado de São Paulo, Brasil. **Boletim de Botânica da Universidade de São Paulo**, p. 65-118, 1988.

DEAK, Dalia *et al.* Progress in the fight against multidrug-resistant bacteria? A review of US Food and Drug Administration–approved antibiotics, 2010–2015. **Annals of internal medicine**, v. 165, n. 5, p. 363-372, 2016.

DEVI, Gopalraj Karthikai et al. In vitro antioxidant activities of selected seaweeds from Southeast coast of India. **Asian Pacific journal of tropical medicine**, v. 4, n. 3, p. 205-211, 2011.

DEYAB, Mohammed; ELKATONY, Taha; WARD, Fatma. Qualitative and quantitative analysis of phytochemical studies on brown seaweed, *Dictyota dichotoma*. **International Journal of Engineering Development and Research**, v. 4, n. 2, p. 674-678, 2016.

- DI FILIPPO-HERRERA, Dania Andrea et al. Monthly variation in the chemical composition and biological activity of *Sargassum horridum*. **Botanica Marina**, v. 61, n. 1, p. 91-102, 2018.
- DUAN, Xiao-Juan et al. Evaluation of antioxidant property of extract and fractions obtained from a red alga, *Polysiphonia urceolata*. **Food chemistry**, v. 95, n. 1, p. 37-43, 2006.
- EL GAMAL, Ali A. Biological importance of marine algae. **Saudi pharmaceutical journal**, v. 18, n. 1, p. 1-25, 2010.
- EL-BAROTY, G. S. *et al.* Contribution to the aroma, biological activities, minerals, protein, pigments and lipid contents of the red alga: *Asparagopsis taxiformis* (Delile) Trevisan. **Journal of Applied Sciences Research**, v. 3, n. 12, p. 1825-1834, 2007.
- EPAND, Raquel F.; SAVAGE, Paul B.; EPAND, Richard M. Bacterial lipid composition and the antimicrobial efficacy of cationic steroid compounds (Ceragenins). **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes**, v. 1768, n. 10, p. 2500-2509, 2007.
- FARASAT, Massoumeh *et al.* Antioxidant properties of some filamentous green algae (Chaetomorpha Genus). **Brazilian archives of biology and technology**, v. 56, p. 921-927, 2013.
- FORZZA, Rafaela Campostrini *et al.* Catálogo de plantas e fungos do Brasil-Vol. 1. JBRJ, 2010.
- GIRIWONO, Puspo Edi *et al.* *Sargassum* seaweed as a source of anti-inflammatory substances and the potential insight of the tropical species: a review. **Marine drugs**, v. 17, n. 10, p. 590, 2019.
- GUO, Yumei *et al.* Frequency, antimicrobial resistance and genetic diversity of *Klebsiella pneumoniae* in food samples. **PLoS One**, v. 11, n. 4, p. e0153561, 2016.
- HARB, Talissa Barroco; CHOW, Fungyi. An overview of beach-cast seaweeds: Potential and opportunities for the valorization of underused waste biomass. **Algal Research**, v. 62, p. 102643, 2022.
- HENWOOD, Caroline J. *et al.* Antimicrobial susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa*: results of a UK survey and evaluation of the British Society for Antimicrobial Chemotherapy

disc susceptibility test. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 47, n. 6, p. 789-799, 2001.

HEO, Soo-Jin *et al.* Antioxidant activities of enzymatic extracts from brown seaweeds. **Bioresource Technology**, v. 96, n. 14, p. 1613-1623, 2005.

IWAMOTO, Chika *et al.* Cytotoxic cytochalasans from a *Penicillium* species separated from a marine alga. **Tetrahedron**, v. 57, n. 15, p. 2997-3004, 2001.

KATO, Komei *et al.* Effects of functional groups and sugar composition of quercetin derivatives on their radical scavenging properties. **Journal of natural products**, v. 79, n. 7, p. 1808-1814, 2016.

KHATUA, SOMANJANA; ROY, TULIKA; ACHARYA, KRISHNENDU. Antioxidant and free radical scavenging capacity of phenolic extract from *Russula laurocerasi*. **Asian Journal of Pharmaceutical Clinical Research**, v. 6, n. 4, p. 156-160, 2013.

LEANDRO, Adriana; PEREIRA, Leonel; GONÇALVES, Ana MM. Diverse applications of marine macroalgae. **Marine drugs**, v. 18, n. 1, p. 17, 2020.

LIM, Sujin *et al.* Evaluation of antioxidant activities of various solvent extract from *Sargassum serratifolium* and its major antioxidant components. **Food chemistry**, v. 278, p. 178-184, 2019.

LIM, Sujin *et al.* Evaluation of antioxidant activities of various solvent extract from *Sargassum serratifolium* and its major antioxidant components. **Food chemistry**, v. 278, p. 178-184, 2019.

LIU, Mi *et al.* Antimicrobial resistance and molecular characterization of gene cassettes from class 1 integrons in *Pseudomonas aeruginosa* strains. **Microbial Drug Resistance**, v. 26, n. 6, p. 670-676, 2020.

LOWY, Franklin D. *et al.* Antimicrobial resistance: the example of *Staphylococcus aureus*. **The Journal of clinical investigation**, v. 111, n. 9, p. 1265-1273, 2003.

MAHENDRAN, Shunmugiah *et al.* Evaluation of antioxidant and cytotoxicity activities of polyphenol extracted from brown seaweed *Sargassum tenerrimum* biomass. **Biomass Conversion and Biorefinery**, p. 1-7, 2022.

- MARTIN, Rebekah M. *et al.* Molecular epidemiology of colonizing and infecting isolates of *Klebsiella pneumoniae*. **MSphere**, v. 1, n. 5, p. e00261-16, 2016.
- MARTIN, Rebekah M. *et al.* Molecular epidemiology of colonizing and infecting isolates of *Klebsiella pneumoniae*. **MSphere**, v. 1, n. 5, p. e00261-16, 2016.
- MARTINEZ, Renata Ferreira Galletti. Potencial bioestimulante do extrato aquoso de alga (*Sargassum cymosum* C. Agardh) em mudas de couve (*Brassica oleracea* L. var. *acephala*). 2015.
- MIGUEL, Maria Graça *et al.* Phenols, flavonoids and antioxidant activity of aqueous and methanolic extracts of propolis (*Apis mellifera* L.) from Algarve, South Portugal. **Food Science and Technology**, v. 34, p. 16-23, 2014.
- MILLEDGE, John J.; NIELSEN, Birthe V.; HARVEY, Patricia J. The inhibition of anaerobic digestion by model phenolic compounds representative of those from *Sargassum muticum*. **Journal of Applied Phycology**, v. 31, n. 1, p. 779-786, 2019.
- MISHRA, Amrit Kumar. *Sargassum*, *Gracilaria* and *Ulva* exhibit positive antimicrobial activity against human pathogens. **Open Access Library Journal**, v. 5, n. 1, p. 1-11, 2018.
- MOORTHI, Puthamohan Vinayaga; BALASUBRAMANIAN, Chelliah. Antimicrobial properties of marine seaweed, *Sargassum muticum* against human pathogens. **Journal of Coastal Life Medicine**, v. 3, n. 2, p. 122-125, 2015.
- MURRAY, P.P. **Manual of Clinical Microbiology**. Washington, DC: ASM Press, 1999.
- OLIVEIRA, Rosiris Sindeaux de Alencar Pires *et al.* **Conceitos alternativos sobre radicais livres: origens, prevalência e intervenções**. 2016. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.
- PÁDUA, M.M. Patologia Clínica para Técnicas – Tomo I Bacteriologia. **Camarate: Lusociência**, Edições Técnicas e Científicas, Lda. p.117-41. 2009
- PATHMANATHAN, Siva Gowri; SAMAT, Nor Azura; MOHAMED, Ramelah. Antimicrobial susceptibility of clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* from a Malaysian Hospital. **The Malaysian journal of medical sciences: MJMS**, v. 16, n. 2, p. 27, 2009.

PETERSON, Julia; DWYER, Johanna. Flavonoids: dietary occurrence and biochemical activity. **Nutrition research**, v. 18, n. 12, p. 1995-2018, 1998.

POLO, Luz K. *et al.* Metabolic profile of the brown macroalga *Sargassum cymosum* (Phaeophyceae, Fucales) under laboratory UV radiation and salinity conditions. **Journal of Applied Phycology**, v. 27, n. 2, p. 887-899, 2015.

POLO, Luz K.; CHOW, Fungyi. Variation of antioxidant capacity and antiviral activity of the brown seaweed *Sargassum filipendula* (Fucales, Ochrophyta) under UV radiation treatments. **Applied Phycology**, p. 1-14, 2022.

PUSPITA, Maya *et al.* Total phenolic content and biological activities of enzymatic extracts from *Sargassum muticum* (Yendo) Fensholt. **Journal of applied phycology**, v. 29, n. 5, p. 2521-2537, 2017.

RAFFA, Demetrio *et al.* Recent discoveries of anticancer flavonoids. **European journal of medicinal chemistry**, v. 142, p. 213-228, 2017.

RAJAURIA, Gaurav; YUAN, Yvonne V. Recent Advances in Micro-and Macroalgal Processing, 2021.

RAJIVGANDHI, Govindan Nadar *et al.* Phytochemical screening and anti-oxidant activity of *Sargassum wightii* enhances the anti-bacterial activity against *Pseudomonas aeruginosa*. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 28, n. 3, p. 1763-1769, 2021.

ROSA, Gonçalo P. *et al.* Seaweed secondary metabolites with beneficial health effects: An overview of successes in in vivo studies and clinical trials. **Marine drugs**, v. 18, n. 1, p. 8, 2020.

ROSALINE, Xavier Devanya *et al.* Screening of selected marine algae from the coastal Tamil Nadu, South India for antibacterial activity. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 2, n. 1, p. S140-S146, 2012.

ROVER, Ticiane *et al.* Caracterização estrutural e ultraestrutural do processo de embriogênese de *Sargassum Cymosum* C. Agardh (Phaeophyceae, Fucales) como modelo de estudo de germinação de algas pardas tropicais e ação da radiação ultravioleta em fases tardias da embriogênese. 2014.

- ROVER, Ticiane et al. Ultrastructural and structural characterization of zygotes and embryos during development in *Sargassum cymosum* (Phaeophyceae, Fucales). **Protoplasma**, v. 252, n. 2, p. 505-518, 2015.
- SANGEETHA, J.; GAYATHRI, S.; RAJESHKUMAR, S. Antimicrobial assessment of marine brown algae *Sargassum whitti* against UTI pathogens and its phytochemical analysis. **Research Journal of Pharmacology and Techonology**, v. 10, n. 6, p. 1905-1910, 2017.
- SANJEEWA, KK Asanka *et al.* Bioactive potentials of sulfated polysaccharides isolated from brown seaweed *Sargassum* spp in related to human health applications: A review. **Food Hydrocolloids**, v. 81, p. 200-208, 2018.
- SHARMA, Priyadarshini et al. Silver nanoparticle-mediated enhancement in growth and antioxidant status of *Brassica juncea*. **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 167, n. 8, p. 2225-2233, 2012.
- SINGLETON, Vernon L.; ROSSI, Joseph A. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdc-phosphotungstic acid reagents. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 16, n. 3, p. 144-158, 1965.
- SOUZA, Cintya de Oliveira *et al.* *Escherichia coli* enteropatogênica: uma categoria diarreio gênica versátil. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**, v. 7, n. 2, p. 79-91, 2016.
- SUJATHA, Ravi; SIVA, Durairaj; NAWAS, P. Screening of phytochemical profile and antibacterial activity of various solvent extracts of marine algae *Sargassum swartzii*. **World Scientific News**, v. 115, p. 27-40, 2019.
- TENOVER, Fred C. Mechanisms of antimicrobial resistance in bacteria. **The American journal of medicine**, v. 119, n. 6, p. S3-S10, 2006.
- TORTORA, G.J.; FUNKE, B.R.; CASE, CL. **Microbiologia** . 10. ed. Porto Alegre: Artmed, 2010.
- VASCONCELOS, ERTTP *et al.* Padrão espacial da comunidade de macroalgas de mesolitoral em ambiente recifal do Nordeste Brasileiro. **Tropical Oceanography**, v. 41, n. 1-2, p. 84-92, 2013.
- WAN, Alex HL *et al.* Macroalgae as a sustainable aquafeed ingredient. **Reviews in Aquaculture**, v. 11, n. 3, p. 458-492, 2019.

YENDE, Subhash R.; HARLE, Uday N.; CHAUGULE, Bhupal B. Therapeutic potential and health benefits of *Sargassum* species. **Pharmacognosy reviews**, v. 8, n. 15, p. 1, 2014.