

ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE EXTRATOS LIPÍDICOS DAS MACROALGAS *Desmarestia anceps* e *Durvillaea antarctica* FRENTE A BACTÉRIAS MULTIRRESISTENTES

ALLISON CARLOS ASSUNÇÃO SILVA¹; MARCO AURELIO ZIEMANN DOS
SANTOS²; CAROLINA LAMBRECHT GONÇALVES³; MARISA CASTRO JARA⁴;
PATRÍCIA SILVA NASCENTE⁵; CLAUDIO MARTIN PEREIRA DE PEREIRA⁶

¹Universidade Federal de Pelotas – allison.silva@ifac.edu

²Universidade Federal de Pelotas – marcziemann@gmail.com

³Universidade Federal de Pelotas – carolina_lamg@yahoo.com.br

⁴Universidade Federal de Pelotas – marisajara@terra.com.br

⁵Universidade Federal de Pelotas – pattsn@gmail.com

⁶Universidade Federal de Pelotas – claudiochemistry@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

Os antimicrobianos são classes de moléculas de origem natural ou sintética que são capazes de inibir o crescimento ou causar a morte de micro-organismos. (BERNATOVÁ et al., 2013). A descoberta destes compostos representou um grande avanço na medicina por permitir o tratamento de infecções bacterianas, até então, sem tratamento (ADEDEJI, 2016).

Os antibióticos melhoraram significativamente a qualidade de vida da população, porém, surge um problema decorrente de seu uso, o desenvolvimento de resistência bacteriana aos antibióticos usados (AHN et al., 2006; STEWART & COSTERTON, 2001). A resistência antimicrobiana é uma grave ameaça que cresce em todo mundo, devido ao surgimento de cepas resistentes e multidroga resistentes (ARIAS & RICE, 2015; HOWARD et al., (2013).

A resistência antimicrobiana cresce de forma acelerada conduzindo a cerca 700.000 mortes por ano (ARIAS & RICE, 2015; HOWARD et al., 2013). Estima-se que em 2050 a resistência antimicrobiana venha a tornar-se uma das principais causas de morte, sendo responsável por ceifar 10 milhões de vidas anuais, em todo o mundo (O'NEILL, 2016).

Nesse cenário, fatores como, pesquisas voltadas a utilização da biodiversidade e bioprospecção de produtos naturais, mostram-se essenciais para o desenvolvimento de novos antimicrobianos, melhoramento dos já existentes, bem como o desenvolvimento de novas formulações farmacêuticas para combater a problemática da resistência microbiana. Neste sentido, as algas de regiões frias como a região Sub-Antártica apresentam características muito específicas na composição de ácidos graxos. Devido a esta especificidade, elas são utilizadas como produto e subproduto nas áreas de alimentos, farmacêutica, cosmética. Porém, ainda pouco estudadas quanto a atividade antimicrobiana de seus compostos lipídicos.

2. METODOLOGIA

Extratos lipídicos:

As algas *Desmarestia anceps* e *Durvillaea antarctica* foram coletadas no verão de 2012 no Chile, na região do Estreito de Magalhães (Punta Arenas) situado na area infralitorânea.

A extração dos lipídios foi realizada a partir do método modificado de BLIGH & DYER, (1959); a derivatização dos ácidos graxos para ésteres metílicos de

ácidos graxos (FAME) baseou-se na metodologia de MOSS, LAMBERT, & MERWIN, (1974). A extração dos esteróides foi realizada segundo a metodologia de LOPES et al. (2011). A caracterização química dos compostos foi realizada por CG-MS e CG-FID.

Utilizou-se nos ensaios microbiológicos o extrato lipídico após a extração por Bligh & Dyer e o mesmo após a derivatização, contendo FAME's; quanto aos esteróides, os mesmos foram utilizados após a extração por saponificação. Teve-se como concentração inicial no poço os valores de 1,25 e 0,625 mg/mL respectivamente, para os extratos obtidos por Bligh & Dyer/esteróides e derivatização.

Preparo do Inóculo:

Para os testes microbiológicos foram utilizadas bactérias multirresistentes de origem hospitalar estocadas no Laboratório de Micologia e Bioprospecção do Departamento de Microbiologia e Parasitologia do IB. Os micro-organismos armazenados em refrigeração foram semeados em meio Ágar Müller-Hinton e incubado a 36°C por 24 h.

Determinação da Concentração Inibitória Mínima:

Para determinar a Concentração Inibitória Mínima (CIM) empregou-se a técnica de Microdiluição em Caldo (MC), de acordo com o CLSI, 2006 (Protocolo M7-A6), para bactérias, adaptado para aos extratos lipídicos. Os extratos lipídicos foram solubilizados em etanol 50% e 50% de caldo Müller-Hinton. Para realizar o teste bacteriano, placas estéreis foram previamente preenchidas com 100µL de caldo Müller-Hinton; realizou-se em seguida dez sucessivas microdiluições (1:2) dos extratos lipídicos. A concentração de solvente empregado foi de 25% e 0,048%, respectivamente, no primeiro poço e último poço.

A CIM foi determinada por método colorimétrico com cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólio (TTC) 0,015%.

Determinação da Concentração Bactericida Mínima:

Para obter a Concentração Bactericida Mínima (CBM), foi utilizada uma alíquota de 5 µL do primeiro poço da microplaca em que houve o crescimento, e de dois poços anteriores a esse (poço onde não se verificou crescimento), as quais foram semeados em placa com meio de cultura Ágar Müller-Hinton e incubadas por 24 h, de forma que se fosse possível determinar as concentrações que foram bactericidas e bacteriostáticas.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os três extratos obtidos das algas de *D. antarctica* e *D. anceps* apresentaram atividade frente as bactérias *Enterobacter faecium* e *Staphylococcus aureus* multirresistentes de origem hospitalar. Sendo que os melhores resultados estão atribuídos a atividade do extrato contendo esteróides, tendo em vista que o mesmo apresentou atividade para ambas cepas. Contudo, para a atividade bactericida (CBM) o extrato derivatização apresentou os melhores resultados frente as três cepas de *Acinetobacter baumannii*, com valores inibitórios na faixa de 0,3125 a 0,156 mg/mL.

Os achados do presente estudo, vão de acordo com o disposto na literatura ROSELL & SRIVASTAVA (1987), analisaram o extrato de nove algas marrom da costa da Columbia britânica, houve uma alta proporção de AG insaturados,

presentes tanto livres quanto na forma de mono, di e triglicerídeos. Nesse estudo, todos os extratos mostraram atividade contra bactérias gram-positivas e gram-negativas.

Table 1. Atividade antimicrobiana *in vitro* de diferentes extratos lipídicos de *D. antarctica* e *D. anceps* frente a bactérias multirresistentes de origem hospitalar

Isolados bacterianos	Concentração Inibitória Mínima (mg/mL)					
	Bligh Dyer		Derivatização		Esteróides	
	<i>D. antarctica</i>	<i>D. anceps</i>	<i>D. antarctica</i>	<i>D. anceps</i>	<i>D. antarctica</i>	<i>D. anceps</i>
<i>Acinetobacter baumannii</i> ¹	--	--	--	--	--	--
<i>Acinetobacter baumannii</i> ²	--	--	--	--	--	--
<i>Acinetobacter baumannii</i> ³	--	--	--	--	--	--
<i>Enterococcus faecium</i>	0,625*	0,625*	0,234*	0,117*	0,625*	0,468*
<i>Enterobacter cloacae</i>	--	--	--	--	--	--
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	--	--	--	--	--	--
<i>Klebsiella oxytoca</i>	--	--	--	--	--	--
<i>Staphylococcus aureus</i>	--	--	0,234*	--	0,625*	0,625*

* Subtração da atividade atribuída ao veículo de diluição (Etanol), cepas em que os extratos lipídicos apresentaram atividade antimicrobiana.

Diversos estudos na literatura também relatam a atividade biológica de ésteres metílicos, tais como os descritos por CHANDRASEKARAN et al. (2008), KANNATHASAN & SENTHILKUMAR (2008).

É possível que a atividade atribuída aos extratos, seja decorrente da ação de ácidos graxos, tendo em vista que há muitos relatos da atividade antimicrobiana desses compostos. Ainda não está muito claro o mecanismo preciso da atividade antimicrobiana atribuída aos ácidos graxos, mas sabe-se que o principal alvo parece ser a membrana celular bacteriana e os vários processos essenciais que ocorrem nela e dentro da mesma (DESBOIS & SMITH, 2010).

4. CONCLUSÕES

Os resultados encontrados no presente estudo mostram-se promissores, contudo é necessário a caracterização química de todos os extratos, para melhor compreensão dos resultados. Somado, pretende-se avaliar a atividade citotóxica dos extratos de forma que se possa avaliar a viabilidade de utilizá-los como agentes antimicrobianos.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adedeji, W. A. (2016). the Treasure Called Antibiotics. *Annals of Ibadan Postgraduate Medicine*, 14(2), 56–57.
- Ahn, J. Y., Choi, I. S., Shim, J. Y., Yun, E. K., Yun, Y. S., Jeong, G., & Song, J. Y. (2006). The immunomodulator ginsan induces resistance to experimental sepsis by inhibiting Toll-like receptor-mediated inflammatory signals. *European Journal of Immunology*, 36(1), 37–45. <https://doi.org/10.1002/eji.200535138>
- Arias, C. A., & Rice, L. B. (2015). A new AAC section: Translating resistance to the bedside. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 59(8), 4365. <https://doi.org/10.1128/AAC.01138-15>

Bernatová, S., Samek, O., Pilát, Z., Šerý, M., Ježek, J., Jál, P., ... Ružicka, F. (2013). Following the mechanisms of bacteriostatic versus bactericidal action using raman spectroscopy. *Molecules*, 18(11), 13188–13199.

Bligh, E. ., & Dyer, W. . (1959). Canadian Journal of Biochemistry and Physiology. *Journal of Biochemistry and Physiology*, 37(8), 911–917.

Chandrasekaran, M., Kannathasan, K., & Venkatesalu, V. (2008). Antimicrobial Activity of Fatty Acid Methyl Esters of Some Members of Chenopodiaceae. *Zeitschrift Für Naturforschung.*, 63c, 331–336.

CLSI. (2006). *Clinical and Laboratory Standards Institute. M2a9* (Vol. 23).
Desbois, A. P., & Smith, V. J. (2010). Antibacterial free fatty acids: Activities, mechanisms of action and biotechnological potential. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 85(6), 1629–1642.

Howard, S. J., Catchpole, M., Watson, J., & Davies, S. C. (2013). Antibiotic resistance: Global response needed. *The Lancet Infectious Diseases*, 13(12),
Kannathasan, K., & Senthilkumar, A. (2008). Larvicidal activity of fatty acid methyl esters of Vitex species against Culex quinquefasciatus. *Parasitol Res*, 103(4), 999–1001.

Lopes, G., Sousa, C., Bernardo, J., Andrade, P. B., Valentão, P., Ferreres, F., & Mouga, T. (2011). Sterol profiles in 18 macroalgae of the portuguese coast. *Journal of Phycology*, 47(5), 1210–1218.

Moss, C. W., Lambert, M. a, & Merwin, W. H. (1974). Comparison of rapid methods for analysis of bacterial fatty acids. *Applied Microbiology*, 28(1), 80–85.

O'Neill, J. (2016). Tackling drug-resistant infections globally: final report and recommendations. *The Review on Antimicrobial Resistance*, (May), 84.

Rosell, K. G., & Srivastava, L. M. (1987). Fatty acids as antimicrobial substances in brown algae. *Hydrobiologia*, 151–152(1), 471–475.

Stewart, P. S., & William Costerton, J. (2001). Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. *The Lancet*, 358(9276), 135–138.