

## BIOPROSPECÇÃO DE METABÓLITOS LIPOFÍLICOS E BIOATIVIDADE DA MACROALGA ANTÁRTICA *Curdiea racovitzae*

CAROLINA FERREIRA VERGARA<sup>1</sup>; TAIS POLETTI<sup>2</sup>; LUCAS MORAES BERNEIRA<sup>3</sup>; ALEXANDRE DE MATTOS MACHADO<sup>4</sup>; CLARISSA MARQUES MOREIRA DOS SANTOS<sup>5</sup>; CLAUDIO MARTIN PEREIRA DE PEREIRA<sup>6</sup>

<sup>1</sup>Universidade Federal de Pelotas- carol8.vergara@gmail.com

<sup>2</sup>Universidade Federal de Pelotas – taispoletti@hotmail.com

<sup>3</sup>Universidade Federal de Pelotas – lucas.berneira@hotmail.com

<sup>4</sup>Universidade Federal de Pelotas – ammgaucho33@gmail.com

<sup>5</sup>Universidade Federal de Pelotas – clafarm.mms@gmail.com

<sup>6</sup>Universidade Federal de Pelotas – claudiochemistry@gmail.com

### 1. INTRODUÇÃO

O ambiente marinho é conhecido pela sua biodiversidade e por ser uma fonte de mais de 25.000 produtos naturais (SHOBIER et al. 2016). Entre os organismos fotossintéticos que habitam ecossistemas aquáticos estão as macroalgas, que dadas suas propriedades biológicas, químicas e reprodutivas, estão se tornando importantes recursos marinhos. Sabe-se que os metabolitos secundários encontrados nesses ecossistemas possuem estruturas químicas únicas que não são comumente encontradas em produtos naturais de plantas terrestres<sup>1</sup>. Nesse sentido, as algas marinhas constituem uma importante reserva de possíveis compostos bioativos que poderiam ser posteriormente aplicados para o uso antimicrobiano (ANDRADE et al. 2013).

A busca por novos compostos bioativos é importante para o combate à resistência antimicrobiana, que vem aumentando em taxas alarmantes. Dada esta crescente demanda por novos medicamentos terapêuticos, há um interesse crescente em metabólitos encontrados em organismos marinhos, uma vez que várias espécies de algas mostraram produzir substâncias bactericidas ou bacteriostáticas. Portanto, extratos de macroalgas podem ser ferramentas importantes para rastrear seu potencial bioquímico e identificar ainda mais os compostos bioativos (SHOBIER et al. 2016).

Apesar de mais de 10.000 espécies de algas marinhas terem sido identificadas apenas alguns representantes foram quimicamente caracterizados a fim de rastrear moléculas de aplicações potenciais. Nos últimos anos, nosso grupo de pesquisa analisou componentes lipofílicos de macroalgas sub-Antárticas ou Antárticas, incluindo ácidos graxos (SANTOS et al. 2017; MARTINS et al. 2016) e esteróis (PEREIRA et al. 2017), e indicou satisfatoriamente suas aplicações biológicas (MARTINS et al. 2018). Nesse sentido, os objetivos deste trabalho foram avaliar a constituição lipofílica do extrato da macroalga antártica *Curdiea racovitzae* e avaliar sua atividade antibacteriana.

### 2. METODOLOGIA

#### 2.1. AMOSTRAGEM E AVALIAÇÃO QUÍMICA

A macroalga *C. racovitzae* (**Figura 1**) foi coletada na Península Antártica entre novembro e dezembro de 2015. A fração lipofílica da macroalga (5g) foi extraída usando *n*-hexano por meio de um aparelho Soxhlet por 6h sendo posteriormente realizada a evaporação do solvente sob pressão reduzida.



**FIGURA 1.** Imagem da macroalga *C. racovitzae* (Fonte: Algaebase)

A amostra foi hidrolisada seguindo a metodologia de SANTOS et al. (2015), onde 10 mg do extrato lipofílico e 10 mL de solução de hidróxido de sódio 0,5 M em solução de metanol/água 50% (v/v) foram constantemente misturados e submetidos a refluxo por 1h. Posteriormente, a solução foi resfriada e acidificada com uma solução de ácido clorídrico 1 M até o pH 2. Além disso, as amostras foram extraídas três vezes com 5 mL de diclorometano. As camadas lipofílicas foram combinadas e secas sob pressão reduzida. Os extratos hidrolisados foram redissolvidos em 100  $\mu$ L de clorofórmio e posteriormente derivatizados com 100  $\mu$ L de N-metil-N- (trimetilsilil) -trifluoroacetamida e 100  $\mu$ L de piridina sob 70 °C por 30 min. Os procedimentos foram realizados em triplicata ( $n = 3$ ), e as soluções resultantes foram analisadas em um GC-MS equipado com uma coluna capilar Rtx-5MS e hélio como gás de arraste.

## 2.2. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ATIBACTERIANA

A atividade antibacteriana foi realizada usando cepas padrão gram-positivas *Staphylococcus aureus* e *Enterococcus faecalis* bem como cepas padrão gram-negativas *Escherichia coli* e *Salmonella typhimurium* de modo que a concentração inibitória mínima (CIM) foi determinada de acordo com o método de microdiluição em caldo. Os extratos lipofílicos da macroalga foram diluídos em um caldo de infusão em concentrações que variaram de 6  $\text{mg.ml}^{-1}$  a 0,0078  $\text{mg.ml}^{-1}$ . Foram realizados controles negativos utilizando somente o caldo e controle positivo usando apenas o caldo e a suspensão bacteriana. O procedimento foi feito em triplicata ( $n=3$ ).

As amostras que apresentaram atividade antimicrobiana tiveram sua Concentração Microbicida Mínima (CMM) determinada. Resumidamente, alíquotas de 5  $\mu$ L foram repicadas em placas de ágar Mueller-Hinton e incubadas a 37°C por 24h. Em seguida, avaliou-se a presença ou ausência de crescimento bacteriano para determinação da atividade bacteriostática ou bactericida. Os experimentos foram feitos em triplicata ( $n=3$ ).

## 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A avaliação química da macroalga *C. cuvitzae* indicou que esse organismo marinho apresentou um rendimento extrativo de  $0,138 \pm 0,003\%$ . Relatos

anteriores na literatura indicam que extratos lipofílicos de macroalgas apresentavam valores que variaram de  $0,12 \pm 0,01\%$  a  $1,74 \pm 0,08\%$  o que está de acordo com os resultados encontrados no presente trabalho (SANTOS et al. 2017; SANTOS et al. 2015). Cabe também indicar que o extrato lipofílico foi composto de 19 potenciais bioativos como pode ser visto na **Tabela 1**.

**TABELA 1.** Componentes da extrato lipofílico da macroalga *C. racovitzae*.

Composto	Concentração (mg.Kg <sup>-1</sup> )	Composto	Concentração (mg.Kg <sup>-1</sup> )
2-Butoxietanol	$30.98 \pm 0.11$	Fitol	$5.66 \pm 0.08$
Colesterol	$28.82 \pm 0.40$	Ácido octadecenóico	$5.19 \pm 0.00$
Ácido etilhexanóico	$11.12 \pm 5.48$	Ciclopentanol	$5.17 \pm 0.02$
Ácido hexadecanóico	$10.10 \pm 0.00$	Ácido eicosapentaenóico	$4.96 \pm 0.07$
Metilciclohexenol	$7.81 \pm 0.11$	Outros	$21.22 \pm 0.18$

Com base na **Tabela 1**, se pode verificar que o extrato lipofílico de *C. racovitzae* é composto por variadas classes químicas que incluem ácidos graxos ( $66,75 \pm 5,01$  mg.Kg<sup>-1</sup>), ácidos carboxílicos ( $14,26 \pm 0,10$  mg.Kg<sup>-1</sup>), álcoois ( $43.97 \pm 0.20$  mg.Kg<sup>-1</sup>) e esteróis ( $28.82 \pm 0.40$  mg.Kg<sup>-1</sup>), por exemplo. A presença destas substâncias pode estar ligada à ativação do metabolismo secundário no organismo marinho como proteção ao ambiente inóspito encontrado na Antártica no qual a macroalga tem que sobreviver a baixas temperaturas, alta incidência de irradiação ultravioleta e baixa disponibilidade nutritiva, por exemplo (BERNEIRA et al., 2020).

A avaliação antimicrobiana de extratos lipofílicos da macroalga indicou que os materiais apresentavam atividade contra a maioria dos micro-organismos testados com exceção de *E. faecalis* que apresentou crescimento bacteriano nas concentrações avaliadas (0,187 a 6 mg.mL<sup>-1</sup>). Em geral, os extratos lipofílicos apresentaram CIMs que variaram de 6 a 1,5 mg.mL<sup>-1</sup> os quais mudaram de acordo com o micro-organismo.

Paralelamente, o CMM das amostras indicou que as concentrações que inibiram o crescimento bacteriano foram bacteriostáticas para os micro-organismos testados. De acordo com os resultados, a *E. coli* teve CIM de 3 mg.mL<sup>-1</sup>. Para *S. aureus*, seu crescimento inibido foi inibido a partir de uma concentração de 6 mg.mL<sup>-1</sup>. Resultados semelhantes foram observados para *S. typhimurium* em que extratos lipofílicos apresentaram CIM de 6 mg.mL<sup>-1</sup>.

De acordo com pesquisas anteriores, a atividade antibacteriana de extratos de macroalgas pode estar associada à presença de ácidos graxos distintos em sua constituição (PACHECO et al. 2018; CORTÉS et al. 2014). Com base nos resultados, essas biomoléculas estavam presentes em quantidades consideráveis nas amostras em comparação com outras classes bioquímicas. Apesar de geralmente apresentarem bioatividades negligenciáveis quando isolados, vários tipos de ácidos graxos em conjunto podem promover a inibição bacteriana provavelmente devido aos efeitos sinérgicos (CORTÉS et al. 2014). Entre os motivos que podem explicar a atividade antimicrobiana dos ácidos graxos estão as características anfipáticas dessas moléculas que podem interagir e penetrar nas membranas induzindo danos e permitindo a difusão de outras moléculas que podem afetar ainda mais outros processos biológicos (MARTINS et al. 2018; PACHECO et al. 2018).

#### 4. CONCLUSÕES

Os resultados mostraram que a macroalga da Antártica *C. racovitzae* apresentou em seu extrato lipofílico uma composição química altamente diversificada e complexa. Evidencia-se também a presença de distintas classes de substâncias bioativas que se relacionam com a capacidade antimicrobiana apresentada pela macroalga indicando que possui um amplo potencial farmacológico e nutracêutico.

#### 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDRADE P.B, BARBOSA M, MATOS R.P, et al. Valuable compounds in macroalgae extracts. **Food Chemistry**, v.138, n.2-3, p.1819-1828, 2013.
- BERNEIRA, L., DA SILVA, C., POLETTI, T., RITTER, M., DOS SANTOS, M.A.Z., COLEPICOLO, P., DE PEREIRA, C.M.P. Evaluation of the volatile composition and fatty acid profile of seven Antarctic macroalgae. **Journal of Applied Phycology**, 2020.
- CORTÉS Y, HORMAZÁBAL E, LEAL H, et al. Electronic Journal of Biotechnology Novel antimicrobial activity of a dichloromethane extract obtained from red seaweed *Ceramium rubrum* ( Hudson ) ( Rhodophyta : Florideophyceae ) against *Yersinia ruckeri* and *Saprolegnia parasitica* , agents that cause dis. **Jornal of Biochemical Technology**, v.17, n.3, p.126-131, 2014.
- MARTINS R.M, NEDEL F, GUIMARÃES V.B.S, et al. Macroalgae extracts from Antarctica have antimicrobial and anticancer potential. **Frontiers in Microbiology**, v.9, p.1-10, 2018.
- MARTINS R.M, SANTOS M.A.Z DOS, PACHECO B.S, et al. Fatty acid profile of the chlorophyta species from Chile's sub-Antarctic region. **Academia Jornal of Scientific Research**, v.4, p.93-98, 2016.
- PACHECO B.S, DOS SANTOS M.A.Z, SCHULTZE E, et al. Cytotoxic Activity of Fatty Acids From Antarctic Macroalgae on the Growth of Human Breast Cancer Cells. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v.6, p.185, 2018.
- PEREIRA C.M.P, NUNES C.F.P, ZAMBOTTI-VILLELA L, et al. Extraction of sterols in brown macroalgae from Antarctica and their identification by liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry. **Jornal of Applied Phycology**, v.29, n.2, p.751-757, 2017.
- SANTOS M.A.Z, COLEPICOLO P, PUPO D, FUJII M.T, DE PEREIRA C.M.P, MESKO M.F. Antarctic red macroalgae: a source of polyunsaturated fatty acids. **Jornal pf Applied Phycology**, v.29,n.2, p.759-767, 2017.
- SANTOS S.A.O, VILELA C, FREIRE C.S.R, ABREU M.H, ROCHA S.M, SILVESTRE A.J.D. Chlorophyta and Rhodophyta macroalgae: A source of health promoting phytochemicals. **Food Chemistry**, v.183, p.122-128, 2015.
- SHOBIER A.H, ABDEL GHANI S.A, BARAKAT K.M. GC/MS spectroscopic approach and antifungal potential of bioactive extracts produced by marine macroalgae. **Egyptian Jornal of Aquatic Research**, v.42, n.3, p.289-299, 2016.