



Faculdade de Ciências

Departamento de Ciências Biológicas

Licenciatura em Biologia Aplicada

Culminação de estudos II

Avaliação da actividade antimicrobiana de diferentes extratos da macroalga castanha *Padina boryana* sobre estirpe bacteriana (*Pseudomonas aeruginosa*) e fúngica (*Candida albicans*).

Autor:

Américo Clésio Matusse

Maputo, Fevereiro de 2024



Faculdade de Ciências

Departamento de Ciências Biológicas

Licenciatura em Biologia Aplicada

Culminação de estudos II

Avaliação da atividade antimicrobiana de diferentes extratos da macroalga castanha *Padina boryana* sobre estirpes bacteriana (*Pseudomonas aeruginosa*) e fúngica (*Candida albicans*).

Supervisando:

Américo Clésio Matusse

Supervisora:

Prof^ª. Doutora Valera Dias

Co-supervisora:

Mestre Alice Manjate

Maputo, Fevereiro de 2024

Índice

AGRADECIMENTOS	i
DECLARAÇÃO DE HONRA	ii
DEDICATÓRIA	iii
LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E ACRÔNIMOS	iv
LISTA DE FIGURAS	v
LISTA DE TABELAS	vi
RESUMO	vii
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Problema.....	3
1.2. Justificativa.....	4
1.3. Objectivos.....	5
1.3.1. Objectivo geral.....	5
1.3.2. Objectivos específicos	5
1.4. Hipóteses	6
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	7
2.1. Macroalgas marinhas.....	7
2.2. Algas do Filo Phaeophyta	8
2.2.1. <i>Padina boryana</i>	8
2.3. Principais metabólitos secundários	9
2.3.1. Polissacarídeos	10
2.3.2. Terpenos.....	11
2.3.3. Compostos fenólicos.....	11
2.4. Microrganismos patogênicos ao homem.....	12
2.4.1. <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	12
2.4.2. <i>Candida albicans</i>	13

2.5.	Testes de sensibilidade aos antimicrobianos (TSA).....	14
2.5.1.	Métodos de disco-difusão em ágar.....	14
3.	ÁREA DE ESTUDO	18
4.	MATERIAL E MÉTODOS	19
5.	METODOLOGIA	20
5.1.	Coleta das algas.....	18
5.2.	Obtenção dos extratos.....	18
5.3.	Teste de esterilidade dos extratos.....	19
5.4.	Ensaio da atividade antimicrobiana dos extratos da macroalga <i>Padina boryana</i> ..	20
5.4.1.	Preparação dos discos e impregnação com diferentes extratos.....	20
5.4.2.	Teste de sensibilidade os diferentes extratos das macroalga alga <i>Padina boryana</i>	21
5.5.	Análise de Dados.....	24
6.	RESULTADOS	25
6.1.	Efeito inibitório dos diferentes extratos de <i>Padina boryana</i> frente à bactéria <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	25
6.2.	Efeito inibitório dos diferentes extratos de <i>Padina boryana</i> frente ao fungo <i>Candida albicans</i>	26
6.3.	Análise de fitoquímica em extratos metanólicos das macroalgas <i>Padina boryana</i> , pelo método de espectrometria de massa por cromatografia em fase gasosa (GC-MS).....	27
7.	DISCUSSÃO	31
8.	CONCLUSÃO	35
9.	LIMITAÇÃO	36
10.	RECOMENDAÇÕES	37
11.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	38
12.	ANEXOS	50

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo dom da vida, pela força, pela protecção e pela saúde que me tem dado durante todo o processo de formação.

Agradecer do fundo do meu coração a minha supervisora Prof^ª. Doutora. Valera Dias por ter aceitado o desafio de caminhar comigo nessa maravilhosa jornada. Pela forma sabia, atenciosa, paciente e carinhosa com a qual orientou-me durante todo processo de elaboração deste trabalho.

Agradeço também, de igual forma, a Mestre Alice Manjate, minha Co-supervisora, que de forma bastante carinhosa e generosa, acolheu-me nas instalações laboratoriais do Departamento de Microbiologia da Faculdade de Medicina e de forma cuidadosa e atenciosa orientou-me na execução prática do presente trabalho. Sou muito grato a ambas pelo aprendizado e disponibilidade dispensada.

Um forte agradecimento aos docentes do Departamento de Química pela receptividade e pelo apoio prestado. De forma particular ao Lic. Silvestre e ao Doutor Eutilério Chaúque.

A todos os funcionários do Departamento de Microbiologia da Faculdade de Medicina, vão os meus agradecimentos, pela simpatia, atenção e pelo auxílio prestado de modo a garantir todas condições para a realização do meu trabalho naquele recinto. A todos colegas que encontrei no mesmo local, em especial a Marília, o meu muito obrigado pelo tempo disponibilizado dando-me acompanhamento na realização do trabalho experimental.

Agradeço do fundo do meu coração, ao dr. Maurício e a dra. Sabina, responsáveis pelo laboratório B9 do DCB, aos meus colegas Írene Ichobora, João Paninga e Leocadia Mondjane pelo apoio durante a realização deste trabalho. De igual modo, agradeço a todos colegas de curso e amigos pelo apoio.

Por fim, mas não menos importantes, agradecer do fundo do coração aos meus pais por sempre apostarem na minha educação e por me mostrarem o caminho a seguir. As minhas irmãs, por guiarem-me sempre para as melhores escolhas e por prontamente estarem para apoiar-me em tudo que for necessário.

A todos que de forma directa ou indirecta apoiaram-me, muito obrigado.

DECLARAÇÃO DE HONRA

Eu, **Américo Clésio Matusse**, declaro por minha honra que este trabalho nunca foi apresentado, na sua essência, para quaisquer fins e é resultado da minha investigação, estando indicadas no texto e no capítulo de referências bibliográficas, todas as fontes por mim consultadas.

Maputo, Fevereiro de 2024

O Autor

Américo Clésio Matusse

DEDICATÓRIA

Este trabalho é dedicado aos meus pais, **Mário Américo Matusse, Cristina Júlio Mabjaia e Isabel Alberto Cumbane Matusse**, pelo amor, pela educação, pelos sacrifícios e pelo incentivo para ser o que eu sou hoje.

Também dedico a minha avó **Angelica Lodina Matlombe** que nunca deixou de acreditar e apoiar-me e as minhas irmãs **Maia Matusse, Jéssica Matusse, Milene Matusse e Judymilia Artur** pelo apoio e conselhos tornando leve toda essa minha caminhada.

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E ACRÔNIMOS

AMR – Resistência antimicrobiana

C. albicans – *Candida albicans*

C₅ H₈ - Isopreno

Da – Dalton

DP – Desvio padrão

GC-MS – Espectrometria de massa por cromatografia em fase gasosa

ICP-MS - Espectrometria de massa por plasma aclopado indutivamente

INSHT – Instituto Nacional de Seguridad e Higiene en al Trabajo

KDa – Kilo Dalton

NIST – National Institute Standard and Technology

CP – controle positivo

CN – controle negativo

OMS – Organização Mundial da Saúde

P. aeruginosa – *Pseudomonas aeruginosa*

Pd-NPs – Nanopartículas de paládio

Split – Repartido, Dividido

TSA – Teste de Sensibilidade aos Antimicrobianos

UFC – Unidade Formadora de Colônia

DCB – Departamento de Ciências Biológicas

K. alvarezii – *Kappaphycus alvarezii*

FC – Fibrose cística

Aw – Clima tropical, com inverno seco

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Espécie em estudo: <i>Padina boryana</i> (Fonte: De Clerck <i>et al.</i> , 2005).....	9
Figura 2: Localização geográfica da ilha de Inhaca.[Fonte: CENACARTA, Maputo (2022)].....	18
Figura 3: Fotografia de réplicas dos resultados do teste antimicobiano dos extratos de <i>P. boryana</i> frente à bactéria <i>P. aeruginosa</i> .(Fonte: Autor)	25
Figura 4: Fotografia de réplicas dos resultados do teste antimicobiano dos extratos de <i>P. boryana</i> frente à bactéria <i>C. albicans</i> (Fonte: Autor)	27
Anexo 1: Fotografia da macroalga <i>P. boryana</i> depois de lavadas em água corrente para retirada de areia e epífitas. (Fonte: Autor).....	50
Anexo 2: Fotografia da macroalga <i>P. boryana</i> triturada em um moinho até a obtenção de um pó fino. (Fonte: Autor).....	50

LISTA DE TABELAS

Tabela Média (\pm DP) do teste da actividade antimicrobiano da Macroalgas <i>P. boryana</i> , em diferentes solventes., frente à bactéria da espécie <i>P. aeruginosa</i> . A análise foi realizada em seis (6) réplicas.....	28
Tabela 2: Média (\pm DP) do teste da actividade antimicrobiano da Macroalgas <i>P. boryana</i> , em diferentes solventes., frente ao fungo da espécie <i>C. albicans</i> . A análise foi realizada em seis (6) réplicas.....	29
Tabela 3: Comparação de níveis de susceptibilidade dos microrganismos aos diferentes extratos da macroalga <i>P. boryana</i>	30
Tabela 4: Composição fitoquímica das macroalgas castanhas <i>P. boryana</i> identificada por GC-MS.....	30

RESUMO

Nos últimos tempos, os microrganismos vêm apresentando resistência aos antibióticos sintéticos o que mostram que é de extrema importância a busca por novas fontes de compostos naturais com propriedades antimicrobianas.

Dentro das macroalgas as *Phaeophyceae*, macroalgas castanhas, têm vindo a demonstrar ter metabólitos como por exemplo os polissacarídeos, os florotaninos, os carotenóides e os esteróis com grande interesse para a indústria farmacêutica. Os metabólitos das macroalgas castanhas possuem várias atividades farmacológicas, tais como atividade antioxidante, anti-tumoral, antifúngica, antiviral ou antibacteriana entre outras, o que pode constituir uma mais-valia no desenvolvimento de novos fármacos..

O presente estudo teve como objectivo avaliar o potencial antimicrobiano da macroalga castanha *Padina boryana* coletada na ilha de Nhaca, baía de Maputo em Moçambique, bem como identificar compostos bioativos presentes na macroalga. As amostras foram lavadas, secas e trituradas. O pó seco foi extraído com recurso a diferentes solventes (acetona, hexano e metanol) aplicando a técnica de maceração. Para avaliação da atividade antimicrobiana dos diferentes extratos da macroalga castanha foi usado o método de disco-difusão em placas de ágar Mueller-Hinton e Sabouraud frente a duas estirpes de microrganismos patogênicos ao Homem. Com base nos resultados, foi possível observar que os três extratos da macroalga castanha apresentaram potencial antimicrobiano sobre o crescimento de *P. aeruginosa* e *C. albicans*, com formação de halos de inibição variando entre 12 a 35.8 mm de diâmetro.

A composição fitoquímica foi analisada usando o GC-MS (Espectrometria de massa por cromatografia em fase gasosa) e identificado com base na biblioteca espectral de massa NIST. Foram identificados 27 fitocompostos, sendo que foram comuns para os três extratos, o Stigmasta-5,24(28)-dien-3-ol, (3.beta.,24Z)- e para os extratos com acetona e metanol, 2-Pentadecanone, 6,10,14-trimethyl-; 3,7,11,15-Tetramethyl-2-hexadecen-1-ol; n-Hexadecanoic acid; 6-Hydroxy-4,4,7a-trimethyl-5,6,7,7-tetrahydrobenzofuran-2(4H)-one; Phytol e Stigmasta-5,24(28)-dien-3-ol, (3.beta.,24Z)-. Os resultados do presente trabalho da macroalga *Padina boryana* a torna alvo de novos estudos para a descoberta de compostos bioativos com propriedades antimicrobianas.

Palavras-chave: Macroalgas, *Padina boryana*, compostos bioativos, atividade antimicrobiana.

1. INTRODUÇÃO

Ao longo da história, a humanidade tem sido vítima de pandemias e epidemias como cólera, peste, febre tifóide, tuberculose e outras doenças infecciosas provocadas por vírus, fungos e bactérias. A descoberta e o desenvolvimento dos antibióticos no início do século XX, mudou drasticamente esse cenário melhorando a saúde e o bem-estar da população (Ferreira, 2020), no entanto, as doenças infecciosas, desenvolveram mecanismos de resistência aos antimicrobianos (Baptista *et al.*, 2013).

Segundo a Organização Pan-Americana de Saúde (OPAS) a resistência antimicrobiana ocorre quando um microrganismo, exposto a antimicrobianos, sofre alterações tornando os medicamentos ineficazes contra o mesmo, aumentando o risco de propagação a outras pessoas, representando então uma crescente ameaça à saúde pública (OPAS, 2022).

Nos últimos anos, a resistência antimicrobiana, vem gerando ameaça para o tratamento de doenças infecciosas (Machado *et al.*, 2021). As infecções por organismos resistentes apresentam taxas de morbidade e mortalidade mais altas, são onerosos, resultam em internações hospitalares mais longas e representam uma carga maior para os sistemas de saúde do que as infecções causadas por organismos suscetíveis (Alefán, 2016). O uso indevido de antibióticos contribui para o crescente aumento de bactérias resistentes, e consequentemente causando uma problemática que fragiliza a saúde pública, assim como o uso sem prescrição médica (Loureiro *et al.*, 2016).

Com os recentes avanços tecnológicos e científicos, muitos produtos naturais estão a ser descobertos e usados como ponto de partida para o desenvolvimento de novos medicamentos (Fang *et al.*, 2020). O conhecimento empírico sobre a utilização de compostos de origem natural tem despertado o interesse da comunidade científica que, cada vez mais, reconhece os produtos naturais como uma fonte importante de novas moléculas que possam inspirar o desenvolvimento de medicamentos inovadores (Fang *et al.*, 2020).

As algas são fonte de fitoquímicos biologicamente ativos e muitos desses compostos foram reconhecidos por possuírem atividade biológica benéfica para a saúde humana e animal (Cabral *et al.*, 2011). Esses compostos desempenham diferentes papéis, como atividade antioxidante, estimulação do sistema imune, equilíbrio do nível hormonal e atividade antimicrobiana (Castro, 2015).

A biotecnologia das algas pode ser desenvolvida para diversas aplicações em diferentes bioprodutos, dentre os quais produção de combustíveis, fármacos, cosméticos e suplementos alimentares, que consistem em produtos de valor agregado e que podem ser produzidos em pequena e média escala, principalmente na China, no Japão e nos Estados Unidos (Brasil e Garcia, 2016). A indústria farmacêutica tem valorizado tais produtos, uma vez que estes apresentam diferentes funções biológicas, promissores alvos terapêuticos e potencial farmacológico (Mayer, 2010).

Estudos sobre o potencial antimicrobiano de uma grande variedade de macroalgas demonstraram que a capacidade de síntese de compostos antimicrobianos não se restringe a apenas um grupo de algas (Hellio *et al.*, 2000; Del Val *et al.*, 2001). Segundo Bansemir *et al.* (2006), os extratos de 26 espécies de algas, usando solventes orgânicos com diferentes polaridades, nomeadamente o (diclorometano, metanol e hexano), demonstraram ser uma fonte promissora de compostos biologicamente ativos, podendo ser utilizados no tratamento profilático e terapêutico de doenças infecciosas e para o desenvolvimento de novos antibióticos.

As espécies do Gênero *Sargassum*, por exemplo, contêm polissacarídeos biologicamente ativos à base de fucoídano que possuem atividade antitumoral, antimicrobiana e antiviral (Huynh *et al.*, 2011).

Existem vários métodos que podem testar extratos de vegetais, tais como, método de difusão em ágar, microdiluição e macrodiluição (Barbosa-Filho *et al.*, 2007) no presente trabalho foi utilizado o método de difusão.

Apesar da existência de pesquisas nesta área, ainda existem poucas informações sobre biomoléculas de algas como base para a produção de medicamentos (Silva, 2017). Parece evidente e crescente o interesse nas algas como fonte de produtos biotecnológicos variados. Neste sentido, o presente trabalho teve por objetivo investigar o potencial antimicrobiano de diferentes extratos da macroalga castanha *Padina boryana* como base para o desenvolvimento de novos fármacos, ao pesquisar a ação inibitória destes extratos sobre microrganismos (bactérias e fungos) patógenos ao Homem.

1.1. Problema

A resistência aos antimicrobianos é uma ameaça crescente à saúde pública a nível global tendo forte impacto na saúde humana quer na saúde animal, assim como um impacto económico nas sociedades atuais. O uso indiscriminado de antimicrobianos é o principal fator de resistência microbiana, assim como o uso de antimicrobianos sem exame de cultura e teste de sensibilidade. Esses dois fatores são os principais no desencadeamento de patógenos de multirresistentes em ambientes hospitalares, onde os fármacos exercem pressão seletiva sobre as cepas resistentes. Tem que se levar em conta, o fator socioeconômico, onde o paciente muitas vezes não possui acesso aos antimicrobianos corretos e se recusam a procurar um atendimento médico, utilizando outros (Da Costa, 2017).

As infeções antimicrobianas registados nos hospitais em pacientes imunocomprometidos, principalmente quando se trata de microrganismos oportunistas, como o fungo *C. albicans*. No entanto, ela faz parte da microbiota do corpo humano, mostrando-se patogénico quando o sistema imunológico do paciente está em declínio, podendo causar infeções conhecidas como candidíase ou candidose (Silva *et al.*, 2015).

A *Pseudomonas aeruginosa* é amplamente reconhecida como uma espécie de referência para estudos sobre a formação de biofilmes, pois coloniza eficientemente diferentes superfícies, tais como superfície de plantas, animais e pele humana, também pode ser encontrada em ambiente hospitalar, como em pias, tubos, equipamentos respiratórios e endoscópios (Fuentefria, *et al.*, 2008) causando infeções crónicas difíceis de erradicar. Trata-se de uma bactéria gram-negativa, patogénica para os humanos, oportunista, que causa doença grave, principalmente em pacientes com fibrose quística (Brindhadevi *et al.*, 2020).

Microrganismos como *Pseudomonas aeruginosa* e *C. albicans* são apontados como um dos principais promotores de infeções resistentes aos antibióticos (Bioemfoco, 2019; Mendes *et al.*, 2020; Santos Jr *et al.*, 2005). A existência desse tipo de microrganismos suscita a necessidade do desenvolvimento de novos fármacos mais eficazes (Da Silva e Nogueira, 2021).

Portanto, tornou-se relevante para este estudo responder a seguinte questão: **Terão os diferentes extratos da macroalga castanhas *Padina boryana* potencial antimicrobiano contra (*Pseudomonas aeruginosa* e *Candida albicans*)?**

1.2. Justificativa

As macroalgas são organismos marinhos muito abundantes, usadas desde os tempos remotos na alimentação humana (especialmente em países asiáticos), como fertilizantes naturais e, empiricamente, no tratamento de algumas patologias (Pereira, 2018b).

Os compostos bioativos de algas têm apresentado importante notoriedade na prospecção de novas drogas de origem marinha, frente à diversidade estrutural química apresentada por esses organismos. A resistência dos microrganismos patogênicos a antibióticos comercialmente conhecidos, instiga a pesquisa por novos fármacos (Amorim *et al.*, 2012). Além dessas, outras atividades como ação antiinflamatória, citotóxica, imunossupressora e anti-helmíntica foram descritas para metabolitos secundários isolados de algas. (Machado *et al.*, 2010; Mayer *et al.*, 2010; Pereira, 2012).

Vários estudos de caracterização química identificaram a presença de diversas moléculas em *P. boryana*, entre os quais monoterpenos halogenados e ácidos gordos polihalogenados. Atualmente, sabe-se que *P. boryana* possui um elevado potencial perspetivando-se que o seu potencial bioativo pode alastrar-se a outras atividades como antiinflamatória, antimicrobiano, citotóxica, imunossupressora e anti-helmíntica (Machado *et al.*, 2010; Mayer *et al.*, 2010; Pereira, 2012). A substituição parcial ou até mesmo total de quimioterápicos sintéticos por substâncias naturais biologicamente ativas frente a microrganismos patogênicos mostram-se relevantes e com grande potencial. De facto, as macroalgas destacam-se nesse contexto por possuírem compostos bioativos com potencial terapêutico promissor frente às enfermidades que acometem ao Homem.

1.3. Objectivos

1.3.1. Objectivo geral:

- Avaliar a actividade antimicrobiana dos extratos (acetona, hexano e metanol) da macroalga castanha *Padina boryana* frente às estirpes bacterianas *Pseudomonas aeruginosa* e fúngicas *Candida albicans*.

1.3.2. Objectivos específicos:

- Determinar a ação inibitória dos diferentes extratos da macroalga castanha *Padina boryana* frente aos microrganismos *Pseudomonas aeruginosa* e *Candida albicans*;
- Comparar a atividade antimicrobiana dos extratos da macroalga *Padina boryana* nos diferentes solventes (acetona, hexano e metanol), através do método de Kirby-Bauer;
- Determinar qualitativamente a composição fitoquímica dos extratos da macroalgas *P. boryana*.

1.4. Hipóteses

Nula: Os extratos da macroalga castanha *Padina boryana* não apresentam atividade antibacteriana contra *Pseudomonas aeruginosa* e *Candida albicans*.

Alternativa: Os extratos da macroalga castanha *Padina boryana* apresentam atividade antibacteriana contra *Pseudomonas aeruginosa* e *Candida albicans*.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Macroalgas marinhas

O termo alga é utilizado para diferentes organismos que, em função da sua dimensão, são classificados em micro ou macroalgas. As microalgas são organismos fotossintetizantes e microscópicos que vivem em suspensão na água (Valentin, 2010). As macroalgas são seres multicelulares com órgãos diferenciados, sendo encontradas habitualmente nas costas rochosas, quer em água doce, quer em água salgada (Mayer, 2010).

As macroalgas marinhas apresentam grande diversidade de tamanho, cor e forma, podendo encontrar-se como crostas na superfície das rochas, apresentando alguns milímetros de comprimento, ou em zonas eufóticas, isto é, zonas com maior profundidade (normalmente até 200 m), onde o limite inferior de penetração da luz é eficaz para a realização da fotossíntese. As macroalgas são organismos bentónicas, uma vez que se encontram fixas a sedimentos (normalmente rochosos) e podem apresentar tamanhos gigantes (superiores a 50 metros), formando florestas aquáticas em algumas regiões (Pal *et al.*, 2014; Pereira, 2010).

As macroalgas apresentam colorações extremamente variadas, que se devem à combinação de diferentes pigmentos fotossintéticos presentes nas suas células e que estão na base da sua classificação em algas verdes, vermelhas e castanhas (Zerrifi *et al.*, 2018).

A nível celular, as algas diferem na sua estrutura e pigmentação fotossintética. De acordo com as diferentes pigmentações, as macroalgas são divididas em três filós principais: Chlorophyta, Rhodophyta e Phaeophyta. As Chlorophytas ou algas verdes caracterizam-se pela predominância de dois pigmentos fotossintéticos, a clorofila a e b. As algas vermelhas ou Rhodophytas apresentam em abundância pigmentos do tipo ficoeritrina e ficocianina. Por fim, as algas castanhas ou Phaeophytas caracterizam-se pela predominância dos pigmentos xantofila e fucoxantina, que mascaram as clorofilas a e c, conferindo-lhes uma tonalidade escura (Zerrifi *et al.*, 2018).

Segundo a base de dados *AlgaeBase* (Guiry & Guiry 2012), atualmente existem cerca de 37 812 espécies de algas, pertencentes ao domínio Eukaryota, sendo as Phaeophyceae cerca de 1 861, as Chlorophyta 5 812, as Rhodophyta 6 570, pertencendo as restantes a outros filós e classes.

2.2. Algas do Filo Phaeophyta

As algas castanhas constituem a maior classe com até 1861 espécies (Guiry & Guiry 2012) e variam em estruturas filamentosas microscópicas a gigantesco (kelps) de muitos metros de comprimentos, com órgãos, tecidos e especialização celular significativos (Graham e Wilcox, 2000; Lee 2008). Este grupo de macroalgas são provavelmente as mais investigadas, pois essas espécies contêm um grupo especial de compostos fenólicos biologicamente ativos chamados florotaninos. Os compostos fenólicos presentes nas espécies de algas castanhas são derivados de unidades de floroglucinol polimerizadas através da via do acetato/polimalonato (Mekinić *et al.*, 2021).

As algas castanhas são bentônicas e habitam quase que exclusivamente o ambiente marinho. Somente 6 espécies em 5 Gêneros vivem em água doce. A maioria das Phaeophyceas cresce na faixa interdital e na região litorânea superior (Guerra *et al.*, 2011; Silva, 2010).

Morfologicamente, algumas algas castanhas apresentam talos mais simples, filamentos, unisseriados e ramificados com poucos milímetros a alguns centímetros. Porém, a grande maioria das Phaeophyceas possui talo verdadeiramente parenquimatoso com grandes variações na forma e tamanho (Guerra *et al.*, 2011). O tipo de reprodução mais comum destas algas é a sexual, e vários tipos de ciclos de vida são registrados (Graham e Wilcox, 2000).

2.2.1. *Padina boryana*

A espécie *P. boryana* pertence ao filo Phaeophyta e é uma alga com camada calcificada branca na superfície superior, geralmente com até 5cm de altura, compostas por lâminas eretas, enroladas, em forma de funil, castanho-claro com uma camada branca calcificada na superfície dorsal (Mayer, 2010). A margem da lâmina distintamente enrolada, lâmina com cerca de 2 cm de diâmetro, apresentam estipe com 0,5 cm de comprimento, fibroso. Lâmina com cerca de 50 µm de espessura no ápice, cerca de 190 µm de espessura perto da base; Lâmina de duas camadas de células acima, três abaixo; células dorsais cerca de duas vezes mais longas que as células ventrais. Soros esporângios nascidos na superfície ventral em anéis concêntricos logo acima das faixas capilares, quatro esporos por esporângio, indúcio visível apenas nas lâminas jovens, gametófitos não vistos (Figura1) (De Clerck *et al.*, 2005).



Figura 1: Espécie em estudo: *Padina boryana* (Fonte: De Clerck *et al.*, 2005)

A espécie *P. boryana* habita de forma epilítica, tipicamente em saliências rochosas onde existe alguma areia, desde a zona eulitoral média até à zona sublitoral rasa. Distribuída desde The Haven (cerca de 150 km a oeste de Port St Johns) até ao norte de Kwazulu-Natal. Distribuição mundial: Moçambique, Tanzânia, Quênia e mundialmente em localidades tropicais e temperadas quentes (Guiry & Guiry 2012).

2.3. Principais metabólitos secundários

Os compostos químicos resultantes dos metabolismos secundário, geralmente são produzidos em resposta à mudanças adversas no ambiente (temperatura, umidade, pressão etc.) e através de mecanismos de defesa contra herbivoria e incrustação, ou seja, a produção de tais compostos é intrínseca à fisiologia dos organismos (Gressler, 2010).

O forte perfil bioativo observado em estudos recentes sugerem que alguns metabólitos de algas podem ser futuramente utilizados como fármacos ou como protótipos de novos agentes antitumorais e antibacterianos (Machado *et al.*, 2010). As algas castanhas produzem uma grande variedade de metabólitos secundários (cerca de 44% entre todos os filós) com diferentes tipos de funcionalidades. A estes metabólitos encontram-se associados grandes potenciais biológicos (Ortalo-Magne *et al.*, 2005).

As macroalgas castanhas são quimicamente compostas por polissacarídeos, proteínas,

compostos fenólicos, ácidos gordos polinsaturados, peptídeos, vitaminas e terpenos. Dos citados, os mais extensivamente investigados e explorados incluem polissacarídeos sulfatados, terpenos e compostos fenólicos (Da Silva, 2014).

2.3.1. Polissacarídeos

Os polissacarídeos representam uma vasta classe estrutural de macromoléculas biológicas compostas por polímeros de monossacarídeos ligados por ligações glicosídicas. Estes compostos possuem uma grande diversidade estrutural que se justifica não só pela existência de diferentes monossacarídeos e seus derivados – por exemplo ácido urónico, mas também pela possibilidade destes se ligarem uns aos outros em diferentes posições (Kang *et al.*, 2015).

Estas macromoléculas possuem potencial como moduladores imunológicos e anticancerígenos. Nas macroalgas castanhas, encontram-se essencialmente ao nível da parede celular sendo essenciais para a manutenção do equilíbrio iónico das células e a sua composição pode variar, com a estação do ano, idade, espécie e localização geográfica. Nas algas os polissacarídeos, constituem uma reserva alimentar, e proporcionam robustez e flexibilidade às mesmas, permitindo-lhes resistir à força da ondulação (Gupta e Abu-Ghannam, 2011).

Nas macroalgas castanhas os polissacarídeos encontram-se presentes em grande quantidade, constituindo, cerca de 76% do seu peso seco (percentagem muito superior à quantidade encontrada nas restantes macroalgas vermelhas e verdes de apenas 10-30% do seu peso seco) (Charoensiddhi *et al.*, 2017; Rodrigues *et al.*, 2015). De entre os polissacarídeos, destacam-se os alginatos, as laminarinas e os fucoidanos. Estes compostos são descritos como detentores de diversas atividades biológicas dentre elas antibacteriano, anti-inflamatório, antioxidante, entre outros (DaCruz, 2018) e antiviral (Ningsih *et al.*, 2020).

2.3.2. Terpenos

Os terpenos pertencem a classe de metabólitos secundários lipofílicos produzidos por diferentes tipos de organismos, como plantas e algas. Estruturalmente constituídos por unidades de isopreno (C_5H_8), de estrutura muito diversa (Da Silva, 2014).

Os carotenoides pertencem a grupo de terpenos presentes em elevada quantidade nas

macroalgas castanhas. Elas desempenham um papel essencial no sistema fotossintético, principalmente no centro de reação dos fotossistemas (Oliveira, 2015).

Os terpenos presentes em macroalgas castanhas, de modo geral, têm demonstrado potencial biológico promissor, incluindo anticâncer, antioxidante, anti-inflamatório, atividades antimicrobianas entre outros (Barbosa, 2014).

2.3.3. Compostos fenólicos

Os compostos fenólicos são compostos monoméricos, oligoméricos ou poliméricos com um anel aromático contendo um ou mais grupos hidroxilo ligados ao anel e incluem os fenóis simples, cumarinas, flavonoides, taninos hidrolisáveis e condensados e florotaninos entre outros (Balboa *et al.*, 2013).

Destes compostos fenólicos mencionados os mais relevantes são os florotaninos uma vez que são metabolitos secundários característicos e exclusivos das macroalgas castanhas (Balboa *et al.*, 2013) eles podem constituir até 14% da biomassa de algas marinhas secas. Os florotaninos são componentes altamente hidrofílicos formados pela polimerização de unidades monoméricas de floroglucinol (1,3,5-tridroxibenzeno) (Charoensiddhi *et al.*, 2017).

As algas castanhas produzem estes compostos para se protegerem a si mesmas contra herbívoros e em condições de estresse, minimizando o dano oxidativo causado pela falta de nutrientes e alta radiação solar principalmente. Estes compostos são atualmente muito estudados devido ao seu potencial uso nas áreas da medicina e farmácia devido às suas propriedades anti-hipertensoras, anticancerígenas, anti-inflamatórias, antialérgicas e antidiabéticas (Barbosa *et al.*, 2014). Por outro lado, apresentam também capacidade de inibir a síntese de melanina, sendo promissores agentes clareadores em cosmética (Balboa *et al.*, 2013).

2.4. Microrganismos patogênicos ao Homem

Entende-se por microbiota uma população de organismos microscópios (vírus, bactérias, fungos, e protozoários) que habitam um ecossistema. Esse ecossistema microbiano exerce

papel fundamental na manutenção do estado de saúde do hospedeiro, enquanto há um equilíbrio na relação comensal. A microbiota humana pode constituir em um total de 900 a 1000 espécies diferentes de microrganismos (Ramirez, 2017).

O benefício mais importante da existência da microbiota é a colonização bem adaptada dessa microbiota, excluindo os micro-organismos patogênicos (Wallace *et al*, 2014).

Os microrganismos da microbiota do Homem em geral apresentam efeito protetor. Mas, quando transferida de um local para outro do corpo, podem causar infecção. Os microrganismos que compõem a microbiota normal podem receber benefícios do hospedeiro, como suplementação alimentar, meio ambiente estável, temperatura constante, proteção e transporte (Wallace *et al*, 2014) existem microrganismos na microbiota humana que estão intimamente relacionados a doenças no homem (Roger, 2022). Dentre os microrganismos causadores de doenças ao homem estão a *P. aeruginosa* e a *C. albicans*.

2.4.1. *Pseudomonas aeruginosa*

O gênero *Pseudomonas* compreende diversos microrganismos em formato de bastonetes, gram-negativos, aeróbios, mesófilos e psicrotróficos, caracterizados por exigências nutricionais simples. Bactérias pertencentes a esse gênero são comumente associadas a deterioração de laticínios (Machado *et al.*, 2015; Capodifoglio *et al.*, 2016). Isso se deve a sua extrema adaptabilidade e versatilidade, além da capacidade de multiplicação em temperaturas de refrigeração (Decimo *et al.*, 2014).

A *Pseudomonas aeruginosa* é uma bactéria que pertence à família *Pseudomonaceae*. Trata-se de um bacilo gram- negativo, recto ou ligeiramente curvado com um tamanho de 2-4 x 0.5-1 micron e móvel graças a presença de um flagelo polar. É caracterizado por produzir uma variedade de pigmentos, como a piocianina (de cor azul esverdeado), a pioverdina (pigmento fluorescente de cor verdeamarelado) e a piorrubina (de cor rocha) (INSHT, 2016). Segundo a OMS, a *P. aeruginosa* é um microrganismos com multirresistência a diversos antimicrobianos através de vários mecanismos e pela capacidade de formar biofilmes.

A *P. aeruginosa* é considerada patógeno oportunista, raramente causa infecções em indivíduos saudáveis. As infecções por esta bactéria são mais frequentes em pacientes hospitalizados imunodeprimidos, principalmente as infecções localizadas, em consequência de processos cirúrgicos ou queimaduras resultando em bacteremias severas (Pessoa, 2013) dependente de quantidades mínimas de nutrientes disponíveis, com grande capacidade de adaptação, inclusive

onde há pouco oxigênio ou em temperaturas elevadas (Ramsay *et al.*, 2016).

2.4.1.1. Mecanismos de resistência a antimicrobianos em *P. aeruginosa*

A *P. aeruginosa* pode se tornar resistente aos antimicrobianos por vários mecanismos, sejam eles extrínsecos ou intrínsecos, como as mutações que induzem alteração da permeabilidade aos antimicrobianos, produção de enzimas, transferência horizontal de genes, além de alterações dos alvos dos fármacos (Poole *et al.*, 2011; Li *et al.*, 2015; Mustafa *et al.*, 2016).

Enzimas associadas à resistência intrínseca, a exemplo de algumas betalactamases e enzimas inativadoras de aminoglicosídeos, são alguns dos principais mecanismos bacterianos para degradar ou modificar os antimicrobianos. Em *P. aeruginosa*, o gene indutível *ampC*, é capaz de inativar os betalactâmicos quando expressa a ampicilinase, um aparato responsável pela susceptibilidade reduzida a diversos antimicrobianos (Courtois; Caspar; Maurin, 2018).

Frequentemente, em *P. aeruginosa* a susceptibilidade reduzida aos carbapenêmicos está relacionada à presença ou aquisição de genes codificadores de carbapenemases, adquiridos por transferência horizontal de genes (THG); eles podem estar localizados em plasmídeos, elementos genéticos móveis que permitem a sua aquisição ou dispersão, representando o meio mais comum de resistência extrínseca (Poirel; Pitout; Nordmann, 2007, 2012; Qiu; Kulasekara; Lory, 2009).

2.4.1.2 Doenças causadas por *Pseudomonas aeruginosa*

A *Pseudomonas aeruginosa* pode ser o agente etiológico de doenças cutâneas leves a graves, como foliculite, erisipela, intertrigo digital e síndrome das unhas esverdeadas (Albuquerque *et al.*, 2019).

A foliculite é uma reação inflamatória no folículo piloso (onde se originam o pelo e o sebo que protege naturalmente a pele), causada geralmente por bactérias, principalmente *pseudomonas aeruginosa*, mas também pode ser causada por fungos (*Malassezia furfur*) ou vírus. (Rascaroli; Silva; Valdameri, 2009).

A inflamação pode ser superficial ou profunda, no primeiro caso afeta apenas a parte superior do folículo piloso, já as profundas atingem todo o folículo piloso. (Albuquerque *et al.*, 2019). As lesões podem ser encontradas em qualquer região do corpo que possua pelos. Nas mulheres é comum nas pernas, virilha e axilas, já nos homens, podem ser encontradas na

barba.

A síndrome da unha verde, também designada por síndrome Goldman-Fox, é uma patologia que se caracteriza por descoloração verde da placa ungueal (cloroníquia), paroníquia proximal e onicólise distal (McNeil *et al.*, 2001; Hengge e Bardeli, 2009). As lesões podem surgir em uma ou duas unhas, com atingimento total ou parcial da placa ungueal, nas unhas das mãos ou dos pés. É geralmente indolor, contudo a região periungueal pode apresentar-se eritematosa, edemaciada e sensível ao toque (Schwartz *et al.*, 2020).

2.4.2. *Candida albicans*

A *Candida* é um género de fungos que pertencem ao filo Ascomycota, à classe *Saccharomycetes* e à família *Cryptococaceae* (Sardi *et al.*, 2013). A *Candida albicans* é um fungo dimórfico, com células ovaladas ou esféricas, variando em tamanho de 2 a 10 micrômetros. Elas são micro-organismos eucarióticos unicelulares e podem se reproduzir tanto assexuada na forma de conídios como por reprodução sexuada. Devido seu âmbito adaptativo, as leveduras se desenvolvem tanto na presença de oxigênio quanto na ausência (Naves, 2013).

O género *Candida* spp. é uma das leveduras mais frequentemente isolada em humanos, em amostras de infeções superficiais e invasivas de diferentes locais do corpo (Colombo *et al.*, 2013). Atualmente o género *Candida* é constituído de aproximadamente 200 espécies diferentes de leveduras, que colonizam diversos sítios corpóreos, tais como, orofaringe, cavidade bucal, dobras da pele, secreções brônquicas, vagina, urina e fezes (Schulze, 2009).

A *Candida* apresenta-se como brotamento e filamentação, podendo ainda, exibir várias morfologias durante seu crescimento formando as hifas, que são estruturas longas e tubulares que se ramificam, e pseudo-hifas (Touil *et al.*, 2020), que são estruturas semelhantes a hifas, mas que permanecem unidas, formando cadeias de células. A coloração das células de *Candida* é geralmente incolor ou levemente pigmentada, variando do branco ao creme (Naves, 2013). Além disso, as células de *Candida* possuem uma parede celular composta principalmente por membrana plasmática fosfolipídica que contém vários esteróis, com predomínio do ergosterol, e quitina (Naves, 2013) uma substância que confere rigidez e resistência às células.

A estirpe *Candida albicans* possui inúmeras características que lhe conferem patogenicidade e são importantes para a identificação correta das espécies de *Candida* em amostras clínicas, sendo por isso, a estirpe dentro deste género mais virulenta e das que causa maior número de infeções (El-Houssaini *et al.*, 2019).

2.4.2.1. Mecanismos de resistência a antimicrobianos em *Candida albicans*

Espécies do género *Candida* apresentam três maneiras principais pelas quais podem se tornar resistentes aos azóis. O primeiro mecanismo é a introdução de bombas multidrogas na parede celular do fungo, que permitem que a célula bombeie a droga, diminuindo a inibição de enzimas e alteração da parede celular do fungo (Araujo *et al.*, 2020).

O segundo mecanismo que pode levar à resistência ao azol é por meio da alteração ou da regulação positiva do gene que codifica para a enzima que está sendo direcionada, *ERG11*. Se *ERG11* é mutado, o resultado é uma alteração no sítio de ligação da enzima, impedindo a ligação dos azóis. No entanto, este mecanismo parece desempenhar um papel mínimo no desenvolvimento de resistência aos azólicos em espécies de *Candida* (Pristov e Ghannoum, 2019).

O mecanismo final é a célula fúngica desenvolver vias de contorno como resultado de mutações. Para evitar a alteração da membrana celular e o acúmulo de produtos tóxicos, forma-se outra via não interrompida pelos azóis que permite ao fungo manter as membranas celulares funcionais (Pristov e Ghannoum, 2019; Araujo *et al.*, 2020).

2.4.2.2. Doenças causadas por *Candida albicans*

As infecções por *Candida*, são denominadas candidíase, uma doença fúngica multifacetada, incluindo infecções mucoso-cutâneas, viscerais e disseminadas, ocasionada pelo desequilíbrio entre o fungo, mucosa e mecanismos de defesa do hospedeiro, beneficiando a transição do patógeno comensal para patogênico, além de que, fora essas condições, o género faz parte da microbiota normal do ser humano (Ribeiro *et al.*, 2019).

Além da candidemia, existem outros tipos de infecções causadas pelo género *Candida*, como por exemplo: Candidíase Vulvovaginal (CVV), Candidíase Oral, Candidíase de Pele, entre outros. De acordo com Plas (2016), a candidíase oral é uma infecção fúngica frequente causada por espécies de *Candida* spp., que está presente na flora oral normal de indivíduos saudáveis, no entanto, uma variedade de fatores sistêmicos e locais pode causar seu crescimento excessivo, tendo uma elevada incidência, principalmente em indivíduos

imunocomprometidos, como por exemplo, portadores de HIV (Vírus da Imunodeficiência Humana) e pacientes de cancro sujeitos a radioterapia de cabeça e pescoço.

Como na candidíase oral, a candidíase cutânea está associada aos portadores de HIV, e, também aos de diabetes mellitus. A candidíase cutânea ocorre constantemente em circunstâncias de umidade, temperatura e pH propícias, principalmente em dobras da pele, abaixo das fraldas de neonatos, e em ar tropical ou no tempo de verão (Barbedo *et al.*, 2013).

2.5. Testes de sensibilidade aos antimicrobianos (TSA)

A crescente incidência de patógenos resistentes aos medicamentos atuais incentiva a busca de novos agentes antimicrobianos (Amparo *et al.*, 2017).

Considerando sua relevância clínica, a realização do antibiograma e sua interpretação não é uma tarefa fácil, por suas limitações e, principalmente, pela crescente descoberta de novos mecanismos de resistência, o que exige cada vez mais atualização e treinamento dos profissionais (Manual de antibiograma, 2019).

A metodologia de Kirby-Bauer para antibiograma é a mais difundida e utilizada até hoje na rotina de análises clínicas, devido a sua praticidade de execução, baixo custo e confiabilidade de seus resultados. Apesar de sua relativa simplicidade de execução, a técnica de Kirby e Bauer exige que as instruções sejam seguidas rigorosamente de forma que os resultados obtidos correspondam à realidade e possam ser comparados com as tabelas internacionais (Manual de antibiograma, 2019).

Diversos estudos vêm sendo desenvolvidos e direcionados à descoberta de novos agentes antimicrobianos provenientes de extratos vegetais e outros produtos naturais, com o objetivo de descobrir compostos com atividade comparada à dos tradicionalmente utilizados, porém, com menor toxicidade, mais eficazes contra a resistência de microrganismos patogênicos e com menor impacto ambiental (De Bona *et al.*, 2014).

O teste de disco-difusão em ágar foi descrito em 1966 por Kirby e Bauer, padronizado entre 1971 e 1975 pelo antigo National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) (Manual de Antibiograma, 2019). O teste fornece resultados qualitativos. É um dos métodos de susceptibilidade mais simples, confiável e mais utilizado pelos laboratórios de microbiologia (Diniz, 2018).

O procedimento consiste no preparo de uma suspensão de bactérias de cultivo recente,

inoculação desta suspensão na superfície de uma placa de Agar Mueller Hinton, e adição dos discos de papel impregnados com antimicrobianos. Após a incubação em estufa, é analisado o padrão de crescimento ou inibição ao redor de cada disco, sendo então medido o tamanho de cada halo e o resultado pesquisado em tabelas apropriadas segundo a espécie bacteriana em análise. Após a incubação em estufa, é analisado o padrão de crescimento ou inibição ao redor de cada disco, sendo então medido o tamanho de cada halo e o resultado pesquisado em tabelas apropriadas segundo a espécie bacteriana em análise (Manual de Antibiograma, 2019).

O método de disco-difusão possui diversas vantagens como baixo custo, metodologia simples, sem necessidade de equipamentos especiais, reprodutibilidade, suplementação do meio. Entretanto, este método apresenta algumas limitações, como ser restrito a microrganismos de crescimento rápido, dificuldade na avaliação da suscetibilidade aos antimicrobianos que se difundem mal através do ágar, dificuldades de interpretação e por não ter a possibilidade de quantificar (Costa, 2016; Diniz, 2018; Manual de Antibiograma, 2019),

2.5.1. Método de disco-difusão ágar

Teste de difusão em ágar ou também designado difusão em placas, é um método físico, no qual um microrganismo é desafiado contra uma substância biologicamente ativa em meio de cultura sólido e relaciona o tamanho da zona de inibição de crescimento do microrganismo desafiado com concentração da substância ensaiada (Manual de antibiograma, 2019).

A avaliação é feita de forma comparativa frente a um padrão biológico de referência (controle positivo) e a zona ou halo de inibição de crescimento é medida partindo-se da circunferência do disco ou poço, até a margem onde há crescimento de microrganismos. De acordo com a dimensão do halo os microrganismos podem ser classificados como: sensíveis, quando o diâmetro da zona de inibição é maior ou não mais do que 3 mm menos que o controle positivo; moderadamente sensíveis, halo maior que 2 mm, mas menor que o controle positivo de mais de 3 mm; e resistente, diâmetro igual ou menor que 2 mm. Como controle positivo, emprega-se um quimioterápico padrão e controle negativo o solvente utilizado para a dissolução dos extratos (Karaman *et al.*, 2003 e Springfield *et al.*, 2003 citado por Cravo, 2019).

3. ÁREA DE ESTUDO

As Amostras da macroalga castanha *Padina boryana* foram coletadas na ilha de Inhaca. Inhaca é uma ilha situada à entrada da baía de Maputo, no sul de Moçambique, com as coordenadas geográficas de 26°S de latitude e 33°E de longitude. Tem uma área de 42 km² e dimensões norte-sul de 12,5 km e este-oeste de 7 km. Está situada a 32 km a leste da cidade de Maputo, de cujo município faz parte administrativamente, constituindo um distrito municipal, o distrito KaNyaka. (Cooper e Pilkey, 2002).

O clima da região é tropical, verão tem muito mais pluviosidade que o inverno e de acordo com a Köppen e Geiger a classificação do clima é Aw. (Langa, 2007). A temperatura média é de 23.3 °C e a pluviosidade média anual é 977 mm. Agosto é o mês mais seco com 15 mm de pluviosidade e Janeiro cai a maioria da precipitação, com uma média de 160 mm de pluviosidade. Fevereiro (temperatura média de 26.2 °C) é o mês mais quente do ano e Julho (temperatura média de 18.5 °C) é o mês mais frio. (Armitage, 2006; ING, 2007).

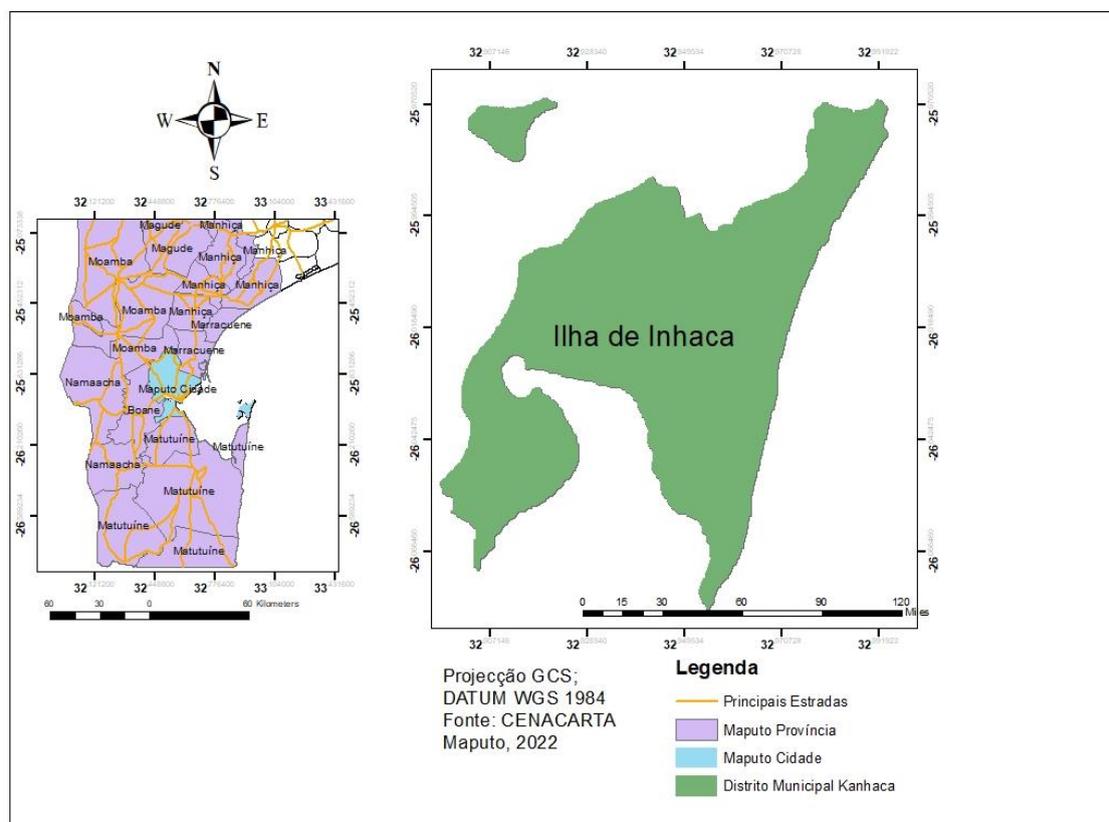


Figura 4: Localização geográfica da ilha de Inhaca. [Fonte: CENACARTA, Maputo (2022)].

4. MATERIAL E MÉTODOS

No presente estudo, foram utilizados matérias e equipamentos disponibilizados pelos laboratórios do Departamento de Ciências Biológicas, Departamento de Química e pela Faculdade de Medicina da UEM, listados abaixo. A amostra da macroalga castanha *Padina boryana* e os microrganismos foram fornecidos pela Faculdade de Medicina.

4.1. Materiais:

- ✓ Placas de Petri;
- ✓ Copos de Becker;
- ✓ Balão Erlenmeyer;
- ✓ Balão volumétrico;
- ✓ Funil de vidro;
- ✓ Proveta graduada;
- ✓ Parafilme;
- ✓ Papel absorvente;
- ✓ Papel de filtro Whatman;
- ✓ Papel alumínio;
- ✓ Colmas;
- ✓ Furador de papael;
- ✓ Micropipetas;
- ✓ Tubos de ensaio;
- ✓ Zaragatoas estéreis;
- ✓ Espátulas;
- ✓ Ansa bacteriológicas;
- ✓ Marcador;
- ✓ Lápis de grafite HB;
- ✓ Luvas;
- ✓ Frigorífico;
- ✓ Estufa de Pasteur
- ✓ Bico de Bunsen;
- ✓ Vórtex;
- ✓ Densitômetro;
- ✓ Parquímetro.

4.3. Soluções:

- ✓ Hipoclorito de sódio;
- ✓ Acetona;
- ✓ Hexano;
- ✓ Metanol;
- ✓ Água destilada;
- ✓ Soro fisiológico a 0,9% de NaCl;
- ✓ Meios de cultura: Ágar Sangue, Ágar Mueller-Hinton, Ágar Dextrose Sabouraud.

4.4. Material biológico

- ✓ Macroalga castanha:
- ✓ *Padina boryana*;

4.5. Microrganismos:

- ✓ *Pseudomonas aeruginosa*;
- ✓ *Candida albicans*;

4.2. Equipamentos laboratoriais:

- ✓ Balança analítica;
- ✓ Estufa de secagem;
- ✓ Moinho;
- ✓ Agitador elétrico;

5. METODOLOGIA

5.1. Coleta das algas

Através de uma amostragem aleatória simples, foram coletadas cerca de 900g da macroalga *Padina boryana*. As amostras foram coletadas manualmente com auxílio de espátulas para a separação destas ao substrato. As macroalgas foram transportadas até o laboratório B9 do departamento de Ciências Biológicas da Universidade Eduardo Mondlane em caixas térmicas (colemanss), em temperaturas baixas proporcionadas por pedras de gelo. No laboratório, as algas foram lavadas em água corrente para retirada de areia e detritos, posteriormente passadas em água com hipocleroto de sódio. As algas limpas foram submetidas ao processo de secagem em uma estufa durante três dias a uma temperatura de 50°C ($\pm 1^\circ\text{C}$). Após esse período as algas foram trituradas em um moinho até obtenção de um pó fino, que foi conservado em frascos secos a temperatura ambiente.

5.2. Obtenção dos extratos

A preparação dos extratos da macroalga foi realizada no Departamento de Biologia da Universidade Eduardo Mondlane. Para a preparação dos extratos foi usada a técnica de maceração de Peres (2016). Em três balões *Erlenmeyer* foram colocado 30g do pó da alga e adicionado 100mL de cada solvente (acetona, hexano e metanol) e foram devidamente identificados. Os copos *Erlenmeyers* foram tampados com papel parafilme para evitar a evaporação e embrulhado em papel de alumínio para evitar a oxidação através da luz. A mistura foi deixada de molho por 24h, posteriormente submetida a agitação em um agitador elétrico por um período de 6 horas; após esse período a solução foi filtrada em copos de *Becker* com auxílio de um funil de vidro interiormente encapado com papel de filtro *Whatman 1* e as soluções obtidas foram evaporadas usando banho-maria, até ao volume de 10mL. Os extratos obtidos foram conservados em tubos de 20mL e estes foram cobertos por um papel de alumínio e armazenados em uma caixa e transportados até a Faculdade de Medicina onde foi realizado o teste de sensibilidade aos antimicrobianos (TSA).

5.3. Teste de esterilidade dos extratos

Para a testagem da esterilidade dos extratos obtidos, no laboratório de microbiologia da faculdade de Medicina, preparou-se numa placa de petri o meio de cultura agar sangue e cultivou-se os extratos em forma de estrias com a ajuda de uma ansa esteril descartavel, de seguida foi incubado por 24 horas. Com o objectivo de verificar a presença de contaminantes nos extratos produzidos, que seria evidenciado através do crescimento de microrganismos.

5.4. Ensaio da atividade antimicrobiana dos extratos da macroalga *Padina boryana*

5.4.1. Preparação dos discos e impregnação com os diferentes extratos

Para preparação dos discos foi usado papel de filtro, tipo "Whatman N°.1" e com auxílio de um furador de papel foram preparados discos uniformes com diâmetro de 5mm. Usando um lápis de grafite, os discos resultantes foram enumerados de 1 a 3 (correspondentes aos diferentes extratos com acetona, hexano e metanol da macroalga *P. boryana*, respectivamente) e uma parte dos discos mantidas em branco (controle negativo). Posteriormente, os discos foram acondicionados em uma placa de Petri de vidro e este foi embrulhado em um papel para permitir a esterilização. A esterilização foi realizada em uma estufa de Pasteur por 30 minutos a uma temperatura constante de 116°C.

Após o período de esterilização e devido arrefecimento dos discos, embebedou-se os discos enumerados com seus respectivos extratos. O processo de impregnação dos discos foi realizado de forma faseada, onde embebedou-se os discos e impregou-se nos meios de cultura com os microrganismos directamente. Todo o procedimento foi realizado ao pé da chama (bico de Bunsen) para evitar a contaminação dos discos.

5.4.2. Teste de sensibilidade aos diferentes extratos da macroalga *Padina boryana*

A avaliação da atividade antimicrobiana dos diferentes extratos (acetona, hexano e metanol) da macroalga foi efetuada pelo método de difusão em disco, segundo a metodologia descrita no Manual de Antibiograma (2019).

Os testes da atividade antimicrobiana foram realizados a partir de culturas puras e de cultivo recente (18h a 24h) de *P. aeruginosa* (cultivados em Ágar Mueller-Hinton) e *C. albicans*

(cultivados em Ágar Dextrose Sabouraud). Foram isoladas das culturas algumas colônias com auxílio de um ansa bacteriológica estéril e adicionadas em tubos de ensaio que continham uma solução salina (soro fisiológico a 0,9% de NaCl). Com ajuda de um misturador (Vortex) a solução foi homogeneizada e em seguida com ajuda de um densitômetro foi medida a turvação com o objetivo de compara-la à turvação padrão na escala de 0,5 de *MacFarland*, que equivale a um valor de absorvância entre 0,08 a 0,1 no comprimento de onda de 580nm e a mesma turvação equivale a $1,2 \times 10^8$ unidades formadoras de colônias (UFC). Com auxílio de uma zaragatoa estéril, foi retirada a suspensão e distribuída de forma suave e em pelo menos 5 direções na superfície das placas de ágar Muller-Hinton (para *P. aeruginosa*) e Dextrose Sabouraud (para *C. albicans*), abrangendo toda superfície das placas.

Após o processo de semeadura, foram colocados os discos, previamente impregnados com os respectivos extratos, na superfície das placas incorporadas com os microrganismos em questão e como controle positivo foram usados discos Ciprofloxacina (5 µg) para a bactéria *P. aeruginosa* e fluconazol (25 µg) para *C. albicans*. As placas foram incubadas em uma estufa a 37°C por 24h para *P. aeruginosa* e para o fungo *C. albicans*. Cada ensaio foi repetido seis (6) vezes. O potencial antimicrobiano dos extratos foi observado através dos halos formados em volta dos discos e foi medido o diâmetro dos halos formados em volta dos discos em milímetro (mm) com auxílio de uma régua.

De acordo com o tamanho do halo formado os microrganismos foram classificados como (Karaman *et al.*, 2003 e Springfield *et al.*, 2003 citado por Cravo, 2019):

- Resistente (-): valor médio do diâmetro do halo de inibição = ou <que 2 mm (Concentrações sistêmicas usuais do antimicrobiano, não inibem o microrganismo, gerando ineficácia clínica.);
- Intermediário (+): valor médio do diâmetro do halo de inibição > 2mm mas <CP (controle positivo) por +3mm (Microrganismos com CIMs do antimicrobiano que alcançam níveis sistêmicos e teciduais, mas a resposta é baixa);
- Sensível (++) : valor médio do diâmetro do halo de inibição > 2mm ou não menos que 3mm que CP (A infecção pode ser tratada com a dosagem recomendada do antimicrobiano).

5.5. Identificação de fitocompostos presentes nos extratos da macroalga *Padina boryana*, pelo método espectrometria de massa por cromatografia em fase gasosa (GC-MS)

A identificação de fitocompostos nos diferentes extratos (acetona, hexano e metanol) da macroalga *P. boryana*, seguiram a metodologia apresentado em de Dias *et al.*, (2020). Foi pesado 5g de pó da amostra de alga, transferida para três frascos e adicionado cada solvente (acetona, hexano e metanol) em cada frasco até que o pó estivesse totalmente imerso. As misturas foram incubadas durante 5 horas e de seguida filtradas com ajuda de um papel de filtro *Whatmann* juntamente. Os filtrados foram então concentrados até 1 ml fazendo borbulhar o azoto gasoso na solução.

Cerca de 2 µl da solução da amostra foi empregado em GC-MS para análise de diferentes compostos. A análise GC - MS foi realizada usando um cromatógrafo de gás do sistema Agilent 7820A GC equipado e acoplado a um detector de massa Turbo mass gold, coluna - 5 MS 30 m (comprimento) 250 µm (diâmetro interno) 0,25 µm (filme). O instrumento foi configurado para temperatura inicial de 110°C, e mantida nesta temperatura por 2 minutos. No final deste período, a temperatura do forno foi aumentada para 280°C, uma taxa de aumento de 5°C/min, e mantida por 9 minutos. A temperatura da porta de injeção foi garantida como 250°C e a taxa de fluxo de hélio como um ml / min. A voltagem de ionização foi de 70 eV.

As amostras foram injectadas em modo “Split” na proporção de 10:1. A faixa de varredura espectral de massa foi fixada em 45-450 (m / z). A interpretação no espectro de massa GC-MS foi conduzida usando o banco de dados do *National Institute Standard and Technology* (NIST) 2014, tendo mais de 62.000 padrões. O nome, peso molecular e a estrutura dos componentes dos materiais de teste foram verificados

5.6. Análise de dados

Os dados obtidos neste trabalho foram introduzidos no programa Microsoft Excel 2013. Posteriormente foram analisadas as variáveis descritivas, média e desvio padrão, em cada ensaio e os resultados obtidos foram apresentados sob forma de tabelas. A estatística inferencial foi realizada utilizando o teste de ANOVA One-Way a um nível de significância de 5% (0.05) através da ferramenta Análise de Dados do programa Microsoft Excel 2013.

6. RESULTADOS

No presente estudo foi testado o potencial antimicrobiano da espécie de macroalga castanha *P. boryana*, sob dois microrganismos patogênicos ao Homem, uma espécie de bactéria (*P. aeruginosa*) e uma espécie de fungo (*C. albicans*).

6.1. Efeito inibitório dos extractos (acetona, hexano e metanol) de *Padina boryana* frente à bactéria *Pseudomonas aeruginosa*

Os valores obtidos na medição dos halos de inibição, são em milímetros (mm). Após a realização do ensaio antimicrobiano, foi observado que os três extratos apresentaram uma destacada acção inibitória contra a bactéria *P. aeruginosa*. O extrato com metanol da macroalga *P. boryana* apresentaram maior acção antimicrobiana exibindo valor médio de diâmetro de halo de inibição de 35.80 (± 3.76) mm, seguido de extratos com acetona da macroalga *P. boryana* com 20.51 (± 4.59) mm e os extratos com hexano da macroalga *P. boryana* apresentaram com menor valor médio de diâmetro de halo de inibição com 12,0 (± 1.82) mm. Como controle positivo foram usados discos de Ciprofloxacina (100/10 μ g) e estes mostraram uma acção inibitória bastante eficaz, tendo-se observado uma média do halo de inibição de 25 (± 0.57) mm (Figura 3).

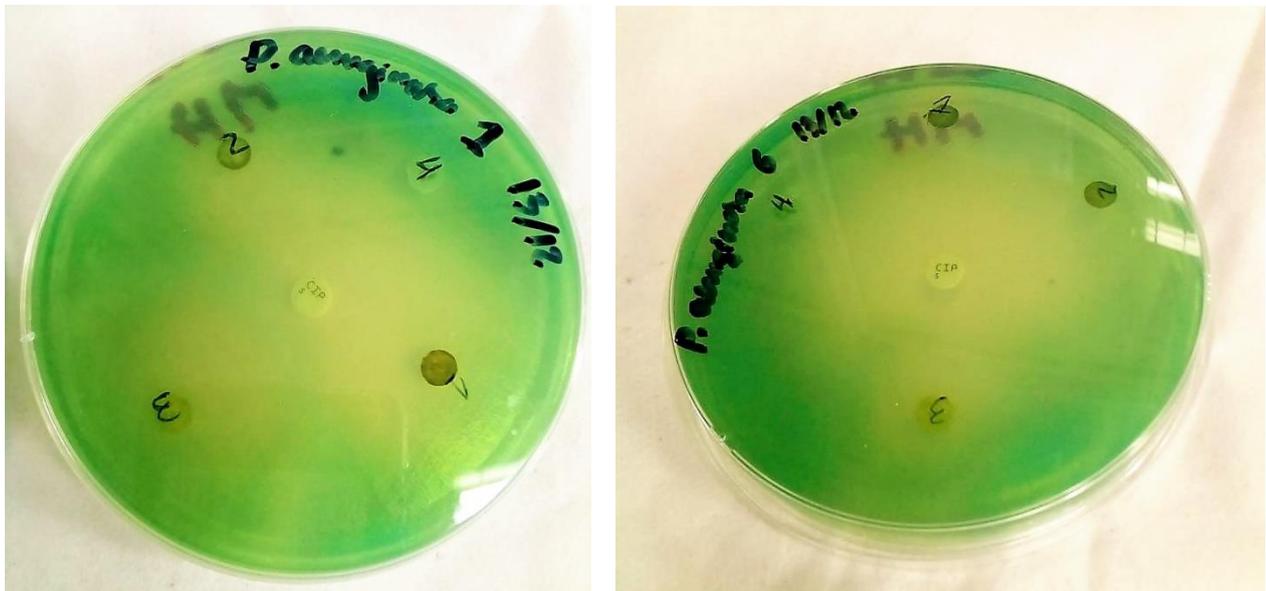


Figura 3: Fotografias dos resultados do teste antimicrobiano dos extratos de *P. boryana* frente à bactéria *P. aeruginosa*. Extratos (1- Acetona, 2- Hexano, 3- Metanol, Ciprofloxacina 5 μ g - controle positivo-). (Fonte: Autor).

Tabela 1: Média (\pm DP) do teste da actividade antimicrobiano da macroalgas *P. boryana*, em diferentes solventes.

Réplicas	Solventes			
	Acetona	Hexano	Metanol	Controle positivo
1	28	11	35	25
2	17	11	40	23
3	19	10	38	25
4	19	14	39	22
5	24	15	32	25
6	16	11	31	25
Média de Halos	20.50	12.00	35.8	24.10
Desvio Padrão	4.59	1.82	3.76	1.33

6.2. Efeito inibitório dos diferentes extractos (acetona, hexano e metanol) de *Padina boryana*, sobre o fungo *Candida albicans*

Os valores obtidos na medição dos halos de inibição, são em milímetros (mm). Após a realização do ensaio antimicrobiano, foi observado que apenas dois extratos apresentaram uma destacada acção inibitória contra a bactéria *C. albicans*. O extrato com metanol da macroalga *P. boryana* apresentou maior acção antimicrobiana exibindo valor médio de diâmetro de halo de inibição de 18.10 (\pm 1.47) mm, seguido de extratos com acetona da macroalga *P. boryana* com 14.00 (\pm 1.67) mm, nos extratos com hexano da macroalga *P. boryana* não apresentaram nenhuma inibição 0 (\pm 0) mm. Para o controle positivo foram usados discos de Fluconazol (25 μ g) e estes mostraram ser ineficiente, a *C. albicans* mostrou resistência contra o antibiotico (Figura 4).

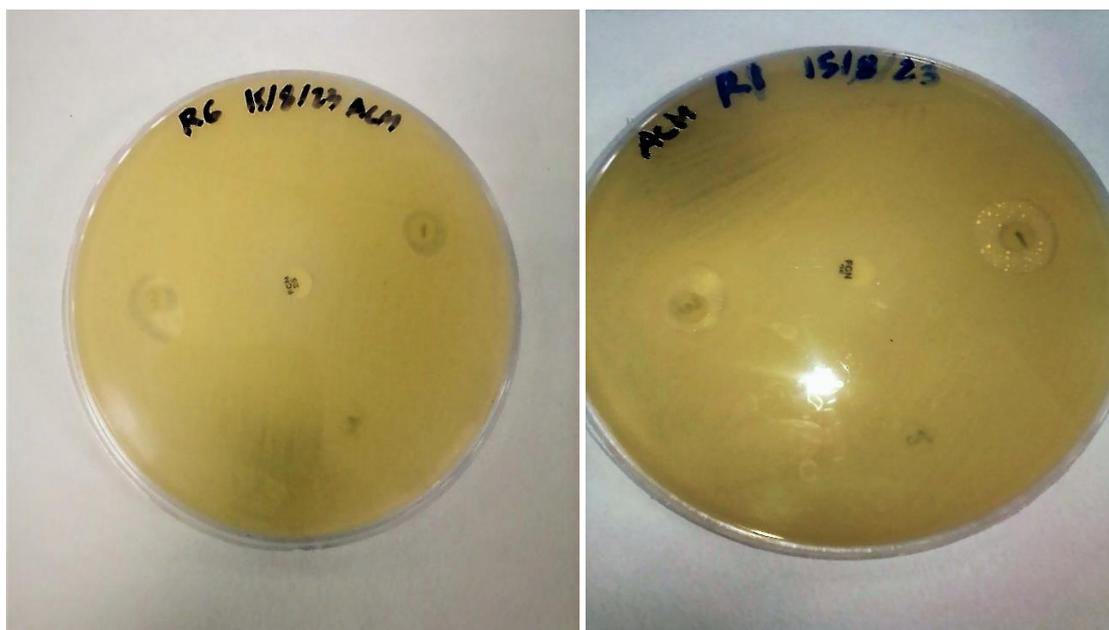


Figura 4: Fotografias dos resultados do teste antimicrobiano dos extratos de *P. boryana* ao fungo *C. albicans*. Extratos (1-Acetona, 2-Hexano, 3-Metanol e Fluconazol 25 μ g - controle positivo). (Fonte: Autor).

Tabela 2: Média (\pm DP) do teste da actividade antimicrobiano da macroalgas *P. boryana*, em diferentes solventes.

Réplicas	Solventes			
	Acetona	Hexano	Metanol	Controle positivo
1	16	0	19	0
2	15	0	16	0
3	12	0	20	0
4	14	0	17	0
5	15	0	19	0
6	12	0	18	0
Média de Halos	14	0	18.1	0
Desvio Padrão	1.67	0	1.47	0

Segundo o tamanho dos halos pode-se observar diferentes padrões de susceptibilidade dos microrganismos aos diferentes extratos da macroalga *P. boryana* (Tabela 3).

Tabela 3: Comparação de níveis de susceptibilidade dos microrganismos aos diferentes extratos da macroalga *P. boryana*

Microragnismo/Extratos	Acetona	Hexano	Metanol
<i>P. aeruginosa</i>	++	+	++++
<i>C. albicans</i>	+	-	++

(-) – Resistente; (++) - Intermediario; (+++) – Sensível. (Cravo, 2019).

6.3. Análise de fitoquímicos em diferentes extratos (acetona, hexano e metanol) da macroalga castanha *Padina boryana* pelo método de espectrometria de massa por cromatografia em fase gasosa.

A partir das análise da composição fitoquímica dos três extratos feitas por espectrometria de massa por cromatografia em fase gasosa (GC-MS) foi possível identificar o total de 27 fitocompostos diferentes. Os extratos da macroalga *Padina boryana* em acetona apresentaram um total de 9 fitocompostos, seguidos dos extratos em hexano com 13 fitocompostos e o metanol com o total de 12 fitocompostos. Dos fitocompostos identificados, um foi comum para os três extratos, nomeadamente: Stigmasta-5,24(28)-dien-3-ol, (3.beta.,24Z)-.

Para os extratos de acetona e metanol foram identificados 6 fitocompostos em comum, nomeadamente: 2-Pentadecanone, 6,10,14-trimethyl-; 3,7,11,15-Tetramethyl-2-hexadecen-1-ol; n-Hexadecanoic acid; 6 Hydroxy-4,4,7a-trimethyl-5,6,7,7atetrahydrobenzofuran-2 (4H)-one; Phytol e Stigmasta-5,24 (28) -dien-3-ol,(3.beta.,24Z) - (Tabela 4).

N°	Nome do fitocomposto	Fórmula	Diferentes solventes		
			Acetona	Hexano	Metanol
1	Methyl tetradecanoate	C15H30O2	-	-	X
2	2-Pentadecanone, 6,10,14-	C18H36O	X	-	X

Avaliação da atividade antimicrobiana de diferentes extratos da macroalga castanha *Padina boryana* sobre estirpes bacteriana (*Pseudomonas aeruginosa*) e fúngica (*Candida albicans*).

	trimethyl-				
3	Methyl stearate	C19H38O2	-	-	X
4	Neophytadiene	C20H38	-	-	X
5	9-Hexadecanoic acid, methyl ester, (z)	C17H32O2	-	-	X
6	3,7,11,15-Tetramethyl-2-hexadecen-1-ol	C20H40O	X	-	X
7	Hexadecanoic acid, methyl ester	C17H34O2	-	-	X
8	n-Hexadecanoic acid	C16H32O2	X	-	X
9	6-Hydroxy-4,4,7a-trimethyl-5,6,7,7atetrahydrobenzofuran-2(4H)-one	C11H16O3	X	-	X
10	9-Octadecenoic acid, methyl ester, (E)-	C19H36O2	-	-	X
11	Phytol	C20H40O	X	-	X
12	Stigmasta-5,24(28)-dien-3-ol, (3.beta.,24Z)-	C29H48O	X	X	X
13	Benzene, 1,3-bis(1,1-dimethylethyl)-	C14H22	-	X	-
14	1H-Tetrazol-5-amine	CH3N5	-	X	-
15	Pentanoic acid, 5-hydroxy-, 2,4-di-t-butylphenyl Esters	C19H30O3	-	X	-
16	1,3-Dimethyl-5-isobutylcyclohexane	C12H24	-	X	-
17	2-Pentadecanone, 6,10,14-trimethyl-	C18H36O	-	X	-
18	Hexanal, 5,5-dimethyl-	C8H16O	-	X	-

Avaliação da atividade antimicrobiana de diferentes extratos da macroalga castanha *Padina boryana* sobre estirpes bacteriana (*Pseudomonas aeruginosa*) e fúngica (*Candida albicans*).

19	1,2-Benzenedicarboxylic acid, bis(2-methylpropyl) ester	C16H22O4	-	X	-
20	Pentadecanal-	C15H30O	-	X	-
21	Phthalic acid, cyclobutyl tridecyl ester	C25H38O4	-	X	-
22	3-Hexanone, 2,5-dimethyl-	C8H16O	-	X	-
23	Oxalic acid, allyl pentadecyl ester	C20H36O4	-	X	-
24	1H-Tetrazol-5-amine	CH3N5	-	X	-
25	2,4-Di-tert-butylphenol	C14H22O	X	-	-
26	17-(1,5-Dimethylhexyl)-10,13-dimethyl-2,3,4,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17-tetradecahydro-1H-cyclopenta[a]phenanthren-3-ol	C27H46O	X	-	-
27	24-Norursa-3,9(11),12-triene	C29H44	X	-	-

(X)- Composto detectado; (-) - Composto não detectado

Tabela 4: Composição fitoquímica das macroalgas castanhas *P. boryana* identificada por GC-MS

7. DISCUSSÃO

Neste estudo pode-se verificar, através de teste de sensibilidade, o potencial antimicrobiano dos extratos de acetona, hexano e metanol da macroalga castanhas da espécie *P. boryana* contra microrganismos patogênicos ao Homem da espécie *P. aeruginosa* e *C. albicans*.

Os três extratos utilizando os solventes acetona, hexano e metanol estudados, mostraram maioritariamente ação antimicrobiana contra as estirpes de *P. aeruginosa* e *C. albicans*. Estes resultados estão de acordo com estudos realizados em várias espécies de algas, como *Sargassum elegans* e *Sargassum ilicifolium* que tem destacado seu potencial anticoagulante, antitumoral, antioxidante (Dore *et al.*, 2013) anti-inflamatório (Saraswati *et al.*, 2019) antimicrobiano e antiviral (Huynh *et al.*, 2011) incluindo espécies de *Padina*, que já demonstrou ter efeito antimicrobiano (Anjali *et al.*, 2019) para microrganismos patogênicos como *S. aureus* e *C. neoformans*.

No estudo feito por Sameeh *et al.*, (2016) utilizando os solventes etanol, hexano e acetona, os extratos da alga *P. boryana* também apresentaram amplo espectro de atividade antimicrobiana contra vários microrganismos testados inclusive contra a *C. albicans*. Lim *et al.* (2008) avaliaram o extrato metanólico de *U. pinnatifida* utilizando a técnica de disco-difusão em ágar, obtendo, dessa forma, um halo inibitório frente ao crescimento de *Staphylococcus aureus*. Bibiana *et al.* (2012) concluiu que os extratos de *K. alvarezii* com diferentes solventes orgânicos (éter etílico, benzina, acetona e ácido etanoico) apresentaram eficácia contra bactérias patogênicas Gram positivas e negativas.

Os compostos produzidos pelo metabolismo secundário, desempenham funções não essenciais à sobrevivência da espécie que o produz, mas estão diretamente relacionadas à manutenção do indivíduo no ambiente e às interações ecológicas. Estas substâncias são comumente limitadas em sua distribuição biológica, na maioria das vezes produzidas em pequenas quantidades, encontradas geralmente em alguns grupos de organismos específicos, revelando, assim, a individualidade das espécies (Hay, 2009).

A composição fitoquímica de *Padina sp* inclui alcaloides, terpenos, saponinas, quinina, flavonoides, polissacarídeos, entre outros (Anjali *et al.*, 2019). Os polissacarídeos presentes nas algas se mostram diferenciados por serem sulfatados, o que lhes confere propriedades diferenciadas e benéficas à saúde (Peso-Echarri *et al.*, 2012), como os fucoidanos, que é característico das algas pardas/castanhas e já mostrou ter atividade antiviral, antitumoral, anti-inflamatória, antioxidante, antimicrobiano (Liu *et al.*, 2012).

O desenvolvimento de resistências a antimicrobianos está intimamente relacionado com a capacidade de determinados microrganismos entrarem em estado de latência, quando expostos a agentes nocivos. Este mecanismo de resistência tem sido verificado para alguns antimicrobianos comerciais que têm como alvo a membrana celular (Windels *et al.*, 2019).

Os diferentes perfis de sensibilidade podem estar vinculados com as diferenças na composição das suas paredes celulares. Estudos relatam que a estrutura e permeabilidade da parede celular são razões de diferentes sensibilidades em bactérias gram-positivas, bactérias gram-negativas e fungos (Albouchi *et al.*, 2013; Kosanić *et al.*, 2012) *P. aeruginosa* e *C. albicans* são algumas das espécies referenciadas pela OMS como uma ameaça para a saúde pública, pelas resistências que possui a diversos antibióticos.

O extrato com o solvente hexano produzido a partir da macroalga *Padina boryana* mostrou-se ineficiente frente ao fungo *C. albicans*. Em um estudo feito por Begum *et al.*, (2018) os extratos da alga *P. boryana* provenientes de diferentes solventes tais como o Diclorometano, petróleo éter e inclusive o hexano, quando testado a sua actividade antimicrobiana pelo método de microdiluição em caldo, também mostraram-se ineficazes contra vários microrganismos incluindo o fungo *C. albicans*. Sugerindo que o solvente hexano não é eficiente para testar actividade frente a fungos.

Dentre os antifúngicos utilizados na terapêutica de candidíases invasivas destacam-se triazólicos, como fluconazol, derivados poliênicos, como anfotericina B, e, do grupo das equinocandinas, a caspofungina (Dignani *et al.*, 2009; Pfaller & Diekema, 2007)

Neste estudo, o fungo *C. albicans* mostrou-se resistente ao fluconazol (controle positivo), confirmando que os microrganismos vem desenvolvendo mecanismos de resistência contra os antibióticos. Jia *et al.*, em 2009, reportaram que o gene RTA2 está envolvido no surgimento de resistência aos azólicos em *C. albicans* por meio da regulação positiva da calcineurina. A calcineurina é uma fosfatase ativada por Ca²⁺ e calmodulina, que está presente em células eucariontes e atua na sinalização da célula fúngica em resposta a estímulos externos (Jia *et al.*, 2009). A RTA2 está envolvida na redução de sensibilidade *in vitro* de *C. albicans* ao fluconazol, bloqueando sua capacidade de danificar a membrana através da regulação da calcineurina (Jia *et al.*, 2012).

A proteína do choque térmico Hsp90 também é um regulador da resposta ao estresse, ela está envolvida de produção de biofilme (Becherelli *et al.*, 2013). O estresse oxidativo induzido pela ação de fluconazol pode ser reparado por resposta adaptativa, contribuindo para a redução da

sensibilidade ao antifúngico (Linares *et al.*, 2013).

As algas castanhas são relatadas com mais de 1.140 metabólitos secundários, sendo estes maioritariamente isolados nos gêneros *Sargassum*, *Dictyota* e *Padina* (Lozano e Pichón, 2018).

Os resultados indicam maior diversidade de fitocompostos para o extrato com o solvente hexano em relação aos outros. Dos fitocompostos identificados, um foi comum para os três extratos, nomeadamente: Stigmasta-5,24(28)-dien-3-ol,(3.beta.,24Z)-.

O Stigmasteol é um fitoesterol presente em numerosas espécies vegetais, cuja principal ação farmacológica é a hipocolesterolemica (Talati *et al.*, 2010). O uso de esteróis demonstrou efeitos redutores não somente sobre os níveis de colesterol total e colesterol LDL, mas também uma tendencia de melhora nos níveis de colesterol HDL (Reiner, 2010). A Agência Nacional de Vigilância Sanitaria (ANVISA) aconselha o uso dos fitoesteróis como auxiliares na redução da absorção de colesterol, mas orienta que o consumo de produtos que contenham estes compostos deve ser associado a uma alimentação equilibrada e a hábitos de vida saudáveis.

Da mesma forma que os fitoesteróis promovem o deslocamento do colesterol das micelas, também podem promover o deslocamento de outros compostos lipofílicos, tais como nutrientes antioxidantes lipossolúveis (Brufau; Canela e Rafecas, 2008).

Estudos epidemiológicos sugerem que o uso de fitoesteróis pode ser associado com a redução da incidência de cânceres comuns como câncer de pulmão, estômago, colon, mama e próstata (Rudkowska, 2010). Estima-se, de modo geral, que o consumo de dietas enriquecidas com fitoesteróis pode reduzir significativamente o risco de câncer em até 20 % (Braford; Awad, 2007).

Segundo informações baseadas nos bancos de dados fitoquímicos e etnobotânicos do Dr. Duke (2013) do Serviço de Pesquisa Agrícola/USDA, os compostos: 1,2-Benzenedicarboxylic acid, bis(2- methylpropyl)-ester e 3,7,11,15-Tetramethyl-2- hexadecen-1-ol são identificados como compostos com atividade antimicrobiana e n-Hexadecanoic acid como um antioxidante e anti-inflamatório.

Balamurugan *et al* (2013) estudou a riqueza das algas marinhas e constatou que elas exibem constituintes com potencial bioativos, como Hexadecanoic acid, methyl ester e 9-Octadecenoic acid, methyl ester, (E)-.

De entre os três solventes usados para a produção de extratos da macroalga *Padina boryana* no

presente estudo, o mas indicado para pesquisas subsequentes é o metanol, pois apresentou os melhores resultados. Sendo que o presente estudo é uma continuidade de outros, pode-se compilar todos eles e formar uma base científica com as informações obtidas para futuramente produzir farmacos/antimicrobianos para estes e/ou mas microrganismos patógenosc.

8. CONCLUSÃO

Com base nos resultados obtidos neste estudo, pode-se concluir que:

- ✓ Os extratos da macroalga *P. boryana*, apresentam actividade antimicrobiana sobre a *P. aeruginosa* e *C. albicans*.
- ✓ A cepa de *C. albicans* não é sensível ao extrato produzido com hexano e ao controle positivo (fluconazol 25 µg).
- ✓ As análises fitoquímicas revelaram que os três extratos da macroalga castanha *Padina boryana* apresentam uma diversidade de compostos fitoquímicos pertencentes às classes potencialmente bioativas como a dos terpenos e ácidos graxos. Fitocomposto como o Stigmasta-5,24(28)-dien-3-ol, (3.beta.,24Z) que apresentam propriedades importantes foi comum para os três extratos.

Pode-se concluir que a macroalga *P. boryana* revela grande importância no desenvolvimento e na descoberta de novas moléculas com capacidade antimicrobiana, que poderão ser utilizados como ponto de partida para o desenvolvimento de novos antibióticos.

9. LIMITAÇÃO

Durante a realização do presente trabalho, o fator limitante foi a medição dos halos de inibição com formação irregular, ou seja, halos com formas não circulares.

10. RECOMENDAÇÕES

O presente trabalho constitui apenas uma base de conhecimento para se prosseguir com a investigação e aplicação da espécie aqui estudada, em termos de sustentabilidade, *P. boryana* não é uma macroalga invasora e, como tal, sendo um recurso natural a sua sobre-exploração pode ser nefasta para o equilíbrio dos ecossistemas. Desta forma, uma aplicabilidade destas descobertas pela indústria farmacêutica ou outras, terá sempre de passar por uma síntese do(s) composto(s) bioativo(s) e/ou aplicação da engenharia genética à biossíntese desses compostos em bioreator, sob condições controladas.

Dessa forma recomenda-se, em estudos futuros analisar:

- ✓ O potencial antimicrobiano desta macroalga em outros microrganismos tais como *Staphylococcus aureus*, *Cryptococcus neoformans* e *Staphylococcus aureus*;
- ✓ Estudo da atividade biológica dos compostos fitoquímicos detetados nesse estudo e avaliação de outros possíveis fitocompostos presentes nas espécies de algas castanhas.
- ✓ A influência de diferentes concentrações dos extratos nos níveis da ação inibitória dessa macroalga;

11. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Albuquerque, Beatriz *et al.* (2019). Vista do Tratamento Estético para foliculite em homens *In: Albuquerque, Beatriz et al. Open Journal Systems*. Mogi das Cruzes: [s. n.], Disponível em: <https://revistas.brazcubas.br/index.php/pesquisa/article/view/569/702>. Acesso em: 12 dez. 2022.
- Alefan, Q., Halboup, A. P. (2016). Pharmacy Practice in Jordan. *In: Pharmacy practice in developing countries*.
- Aloush V., Navon-Venezia S., Seigman-Igra Y., Cabil IS., Carmeli Y. (2006). Multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: risk factors and clinical impact. *Antimicrob Agents Chemother*. 50(1): 43-8.
- Amorim, R.N.S.; Rodrigues, J. A. G.; Holanda, M. L. *et al.* (2012). Antimicrobial Effect of a Crude Sulfated Polysaccharide from the Red Seaweed *Gracilaria ornata*. **Brazilian archives of biology and technology**. Vol.55, n. 2: pp. 171 -181, MarchApril.
- Amparo, T. R., Braga, V. C. C., Seibert, J. B., De Souza, G. H. B., Teixeira, L. F. M. (2017). Métodos para avaliação *in vitro* da atividade antimicrobiana de plantas medicinais: a necessidade da padronização. *Infarma-Ciências farmacêuticas*. v.30.ed.1.50.
- Anjali, K.P. *et al.* (2019). Bioprospecting of seaweeds (*Ulva lactuca* and *Stoechospermum marginatum*): The compound characterization and functional applications in medicine-a comparative study. **J Photochem Photobiol B**. v. 200; n. 111622.
- Araujo, I. M.; Lopes, L. P.; Cruz, C. M. (2020). Caracterização sistemática da resposta imune à infecção por *Candida*. **Brazilian Journal of Health Review**, v. 3, n. 2, p. 3788–3803.
- Armitage, S.J.; Botha, G.A.; Duller, G.A.T.; Wintjw, A., Rebêlo, L.P.; Momade, F.J. (2006). The formation and evolution of the barrier islands of Inhaca and Bazaruto, Mozambique. *Geomorphology* 82, 295-308.
- Azam, M.W.; Khan, A.U. (2019). Updates on the pathogenicity status of *Pseudomonas aeruginosa*. *Drug Discov*. v. 24, n. 1, p. 350-359. DOI:10.1016/j.drudis.2018.07.003
- Balamurugan M., Ganapathy Selvam G., Thinakaran T. & Silvakumar K. (2013). Bioquímico Estudo e análise por GC-MS de *Hypnea musciformis* (Wulf.) Lamouroux.

AEJSR, 8(3): 117-123.

➤ Bandeira, S. O. (1998). The seaweed resources of Mozambique. *In: Critchley, A. T. and Ohno, M. (Eds), Seaweed resources of the world. Kanakawa International Fisheries Training Center, Japan International Cooperation Agency (JICA): pp. 413-431.*

➤ Bansemir, A.; Blume, M.; Schröder, S.; Lindequist, U. (2006). Screening of cultivated seaweeds for antibacterial activity against fish pathogenic bacteria. **Aquaculture**, v. 252, p. 79-84.

➤ Baptista, Maria Galvão de Figueiredo Mendes *et al.* (2013) Mecanismos de resistência aos antibióticos. Dissertação de Mestrado. Curso de Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologia, Lisboa.

➤ Barbedo LS *et al.* (2013). Etiologia dos casos de candidíase cutânea atendidos no serviço de micologia da Universidade Federal Fluminense, Brasil. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiologia*, 33: 53-59.

➤ Barbedo LS, Sgarbi DBG (2010). Candidiasis. *J bras Doenças Sex Transm*, 22(1): 22-38.

➤ Barbosa, M., Valentão, P., Andrade, P. B. (2014). Bioactive compounds macroalgae in the new millennium: Implications for neurodegenerativr diseases. *Marine drus*. 12,

➤ Barbosa-Filho J.M.; Nascimento-Júnior, F.A.; Tomaz A.C.A.; Athayde-Filho, P.F.; Silva M.S., Cunha E.V.L.; Souza M. F. V.; Batista L. M.; Diniz M.F.F.M. (2007). Natural products with antileprotic activity. *Rev Bras Farmacogn* 17: 141-148.

➤ Barnes, R. A. (2008). Early diagnosis of fungal infection in immunocompromised patients. **J Antimicrob Chemother**, 61(Suppl 1):i3-6.

➤ Becherelli M, Tao J, Ryder NS. (2013). Involvement of heat shock proteins in *Candida albicans* biofilm formation. *J Mol Microbiol Biotechnol*. 23(6):396-400.

➤ Begum, S., Nyandoro, S. S., Buriyo, A. S., Makangara, J. J., Munissi, J., Avery, V. M., Erdelyi, M. (2018). Bioactivities of extracts, debromolaurinterol and fucosterol from macroalgae species. *Tanzania Journal of Science*. 44(2):110-111.

➤ Begum, S., Nyandoro, S. S., Buriyo, A. S., Makangara, J. J., Munissi, J., Avery, V. M., Erdelyi, M. (2018). Bioactivities of extracts, debromolaurinterol and fucosterol from macroalgae species. *Tanzania Journal of Science*. 44(2):110-111.

- Bibiana, M. A.; Nithya, K.; Manikandan, M. S.; Selvamani, P.; Latha, S. (2012). Antimicrobial evaluation of the organic extracts of *Sargassum wightii* (brown algae) and *Kappaphycus alvarezii* (red algae) collected from the coast of Meemesal, Tamilnadu. **Int. J. Pharm. Chem. Biol. Sci.**, v. 2, p. 439-446.
- Boukid, Fatma; Castellari, Massimo. (2021). Food and beverages containing algae and derived ingredients launched in the market from 2015 to 2019: a front-of-pack labeling perspective with a special focus on Spain. *Foods*, v. 10, n. 1, p.173.
- Braford, G. P.; Awad, B- A. (2007). Phytosterols as anticancer compounds. *Molecular Nutrition and Food Research*, Weinheim, v. 51, n. 2, p. 161-170.
- BRASIL, B.; GARCIA, L. C. Microalgas: Alternativas Promissoras Para A Indústria. *Agroenergia em revista*, 2016.
- Brindhadevi, K.; LewisOscar, F.; Mylonakis, E.; Shanmugam, S.; Verma, T.N. & Pugazhendhi, A. (2020). Biofilm and Quorum sensing mediated pathogenicity in *Pseudomonas aeruginosa*. *Process Biochemistry*. 96: 49-57.
- Brufau, G.; Canela, A.M; Rafecas, M. (2008). Phytosterols: Physiologic and metabolic aspects related to cholesterol-lowering properties. *Nutrition Research*, New York, v. 28, n. 4, p. 217-225.
- Capodifoglio, E., Vidal, A., Lima, J., Bortoletto, F., D'Abreu, L. F., Gonçalves, A., Vaz, A., Balieiro, J., & Netto, A. S. (2016). Lipolytic and proteolytic activity of *Pseudomonas* spp. isolated during milking and storage of refrigerated raw milk. *Journal of Dairy Science*, 99 (7), 5214–5223. <https://doi.org/10.3168/jds.2015-10453>
- Colombo, A.L. *et al.* (2013). “Brazilian guidelines for the management of candidiasis- a joint meeting reporto of three medical societies: Sociedade brasileira de infetologia, Sociedade Paulista de Infetologia and Sociedade Brasileira de Medicina Tropical”. *The Brazilian Journal of Infectious Diseases*, v.3, n.17, p.283-312.
- Cooper, J.A.G.; Pilkey, O.H., 2002. The barrirt islands of southern Mozambique. *Jornal of Coastal Research*. 36, 164-172.
- Costa, L. F. R. (2016). Sistema de automatização do antibiograma por disco-difusão em aplicação clínica e ambiental. Tese de Mestrado. 24pp. Brasília. Universidade de Brasília.
- Courtois, N.; Caspar, Y.; Maurin, M. (2018). Phenotypic and genetic resistance traits

of *Pseudomonas aeruginosa* strains infecting cystic fibrosis patients: A French cohort study. *IntJ Antimicrob Agents*. v. 52, 3, p. 358-364. DOI: 10.1016/j.ijantimicag.2018.05.008.

- Cravo, T. V. E. (2019). Estudo da biodiversidade de óleos essenciais de várias plantas e de compostos isolados. Tese de Mestrado. 31pp. Universidade de Aveiro.
- Da Costa, Anderson Luiz Pena; Junior, Antonio Carlos Souza Silva. (2017). Resistência bacteriana aos antibióticos e Saúde Pública: uma breve revisão de literatura. *Estação Científica (UNIFAP)*, v. 7, n. 2, p. 45-57.
- Da Cruz, A. R. L. (2018). A importância das macroalgas castanhas para o desenvolvimento de nutracêuticos. Tese de Licenciatura. 4-6pp. Porto. Universidade Fernando Pessoa.
- Da Silva, L. O. P., Nogueira, J. M. R. (2021). Resistência bacteriana: potencial de plantas medicinais como alternativa para antimicrobianos. *Ver. Bras. Anal. Clin.* 53(1):21
- Da Silva, R. G. (2014). Estudos em *Bifucaria bifurcata*: aquacultura, atividade antioxidante e antifúngica. Tese de Mestrado. 7-8pp. Universidade de Coimbra.
- De Clerck, O., Bolton, J. J., Anderson, R. J., Coppejans, E. (2005). Guide to the seaweeds of Kwazulu-Natal. v.33. 112pp.
- Decimo, M., Morandi, S., Silveti, T., & Brasca, M. (2014). Characterization of Gram-negative psychrotrophic bacteria isolated from Italian bulk tank milk. *Journal of Food Science*, 79(10), M2081–M2090. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.12645>
- Del Val, A. G.; Platas, G.; Basilio, A.; Cabello, A.; Gorrochategui, J.; SUAY, I. (2001). Screening of antimicrobial activities in red, green and brown macroalgae from Gran Canaria (Canary Islands, Spain). *Int. Microbiol.*, v. 4, p. 35-40.
- Deveau, A.M. *et al.* (2016). Antimicrobial activity of extracts from macroalgae *Ulva lactuca* against clinically important *Staphylococci* is impacted by lunar phase of macroalgae harvest. *Lett Appl Microbiol*. v. 62; n. 5; p. 363-71.
- Dias, V., Bandeira, S., Chúque, E., Lipassula, M., Mussagy, A. (2020). Evaluation of phytochemicals and Chemical elements present in selected species of seaweeds, to sustain future quantitative analysis for bioactive compounds. *Journal of Drug Delivery and Therapeutics*. 10(5):233.

- Dignani MC, Solomkin JS, Anaissie EJ. (2009). *Candida*. In: Anaissie, EJ, Mcginnis, MR, Pfaller MA. Clinical Mycology. 2nd ed., Amsterdam: Elsevier.
- Diniz, C. G. (2018). Bacteriologia. Roteiro de aulas práticas. 60pp. Universidade UFIF.
- Domínguez H. (2013). Functional ingredients from algae for foods and nutraceuticals. Domínguez H, editor. Oxford, UK: Woodhead Publishing Limited.
- Dore, C.M.P.G. *et al.* (2013). A sulfated polysaccharide, fucans, isolated from brown algae *Sargassum vulgare* with anticoagulant, antithrombotic, antioxidant and anti-inflammatory effects. *Carbohydr Polym.* v. 91; n. 1; p. 467-75.
- Dr. Duques. (2013). Bancos de dados fitoquímicos e etnobotânicos Fitoquímicos e Bases de Dados Etnobotânicos. www.ars-gov/cgi-bin/duke/.
- El-Houssaini, H. H., Elnabawy, O. M., Nasser, H. A., and Elkhatib, W. F. (2019). “Correlation between antifungal resistance and virulence factors in *Candida albicans* recovered from vaginal specimens”. *Microb. Pathog.* 128, 13–19.
- Ferreira, M. E. S. (2020). Determinação da potência de antibióticos. Ensaio de difusão em agar. Ribeirão Preto. 15-16pp. Disciplina de controle de qualidade de produtos farmacêuticos e de cosméticos. Universidade de São Paulo.
- Gressler, V.; Yokoya, N. S.; Fujii, M. T.; Colepicolo, P.; Mancini Filho, J.; Torres, R. P.; Pinto, (2010). E. Lipid, fatty acid, protein, amino acid and ash contents in four Brazilian red algae species. *Food Chemistry*, v.120, p. 585-590.
- Guiry, M. D. (2007). *AlgaeBase version v1.0b1*. World-wide electronic publication, National University of Ireland, Galway [<http://www.algaebase.org>.]
- Guiry, M.D. & Guiry, G.M. (2012). *AlgaeBase*. World-wide electronic publication, National University of Ireland, Galway. <http://www.algaebase.org>; searched February.
- Hachette TF, Gupta R, Marrie TJ. (2000). *Pseudomonas aeruginosa* community acquired pneumonia in previousl healthy adults: case report and review of the literature. *Clin Infect Dis.* 31(6): 1349-56.
- Hay, M. E. (2009). Marine Chemical Ecology: Chemical Signals and Cues Structure Marine Populations, Communities, and Ecosystems. *Annual Review of Marine Science.* 1: 193–212.
- Hellio, C.; Bremer, G.; Pons, A. M.; Gal, Y. L.; Bourgougnon, D. (2000). Inhibition

of the development of microorganisms (bacteria and fungi) by extracts of marine algae from Brittany, France. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* v. 54, p. 543-9.

- Hengge UR, Bardeli V. (2009). Images in clinical medicine. Green nails. *N Engl J Med.* 360:1125.doi: 10.1056/NEJMicm0706497.
- Infecções por *Pseudomonas aeruginosa*. 2pp- www.ciencianews.com.br.
- ING - Instituto Nacional de Geologia. *Carta Geológica Nacional*. Maputo: Direcção Nacional de Geologia, 2007.
- INSTHT-Instituto Nacional de Seguridad e Higiene en al Trabajo. (2012). Fichas de agentes biológicos-*Candida albicans*: 1.
- INSTHT-Instituto Nacional de Seguridad e Higiene en al Trabajo. (2016). Fichas de agentes biológicos-*Pseudomonas aeruginosa*: 1.
- Jia XM, Wang Y, Jia Y, Gao PH, Xu YG, Wang L, *et al.* (2009). RTA2 is involved in calcineurin-mediated azole resistance and sphingoid longchain base release in *Candida albicans*. *Cell Mol Life Sci.* 66(1):122-34.
- Jia Y, Tang RJ, Wang L, Zhang X, Wang Y, Jia XM, *et al.* (2012). Calcium-Activated-Calcineurin Reduces the *In Vitro* and *In Vivo* Sensitivity of Fluconazole to *Candida albicans* via Rta2p. *PLoS One.* 7(10):e48369.
- Langa, J. V. (2007). Problema na zona costeira de Moçambique com ênfase para a costa de Maputo. Moçambique.
- Lee, R. E. (2008). *Phycology*. Fourth edition. 4pp. United States of America. Cambridge University Press.
- Li, X. Z., Plésia, T.P., Nikaido, H. (2015). The challenge of efflux-mediated antibiotic resistance in Gram,-negative bacteria. *Clin Microbiol.* v. 2015. DOI: 10.1128/cmr. 0017-14.
- Lim, J. H.; Jung, K. S.; Lee, J.; Jung, E.; Kim, D. K.; Kim, Y.; Kim, Y-W.; Park, D. (2008). The study on antimicrobial and antifungal activity of the wild seaweeds of Jeju Island. *J. Soc. Cosmet. Scient. Korea*, v. 34, p. 201-207, 2008.
- Linares CE, Giacomelli SR, Altenhofen D, Alves SH, Morsch VM, Schetinger MR. (2013). Fluconazole and amphoterecin-B resistance are associated with increased catalase and superoxide dismutase activity in *Candida albicans* and *Candida dubliniensis*. *Rev Soc Bras Med Trop.* 46(6):752-8.

- Liu, L. *et al.* (2012). Towards a better understanding of medicinal uses of the brown seaweed *Sargassum* in Traditional Chinese Medicine: a phytochemical and pharmacological review. *J Ethnopharmacol.* v. 142; n. 3; p. 591-619.
- Liu, L., Heinrich, M., Meyers, S., Dworjanyn, S. A. (2012). Towards a better understanding of medicinal uses of the brown seaweed *Sargassum* in traditional Chinese Medicine: A phytochemical and pharmacological review. *Journal of Ethnopharmacology.* 142: 591.
- Loureiro, R. J.; Roque, F.; Rodrigues, A. T.; Herdeiro, M. T.; Ramalheira, E. (2016). O uso de antibióticos e as resistências bacterianas: breves notas sobre a sua evolução. *Revista portuguesa de saúde pública*, v. 34, n.1, p. 77-84.
- Machado, C. S., Silva, J. M., Filgueiras, L. P. C., Maciel, A. L. (2021). Resistência antimicrobiana: uso indiscriminado de antibióticos e os impactos na sociedade. *Revista Saúde e Desenvolvimento Humano.* v.9. n.1.
- Machado, F. L. S., Kaiser, C. R., Costa, S. S., Gustinari, L. M. e Soares, A. R. (2010). Atividade biológica de metabolitos secundários de algas marinhas do gênero *Laurencia*. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 20(3), 441-452 p.73.
- Manual de Antibiograma (2019). Laborclin Produtos para Laboratórios Ltda. 3-4pp.
- Mayer, A.M.S.; Glaser, K.B.; Cuevas, C.; Jacobs, R.S.; Kem, W.; Little, R.D.; McIntosh, J.M.; Newman, D.J.; Potts, B.C.; Shuster, D.E. (2010). The odyssey of marine pharmaceuticals: a current pipeline perspective. *Cell Press*.
- McNeil SA, Nordstrom-Lerner L, Malani PN, Zervos M, Kauffman CA. (2001). Outbreak of sternal surgical site infections due to *Pseudomonas aeruginosa* traced to a scrub nurse with onychomycosis. *Clin Infect Dis.* 33:317-23. doi: 10.1086/321890.
- Mekinić IG, Šimat V, Botić V, Crnjac A, Smoljo M, Soldo B, *et al.* (2021). Bioactive phenolic metabolites from adriatic brown algae *Dictyota dichotoma* and *Padina pavonica* (Dictyotaceae). *Foods.*10 (6).
- Mendes, F. L. R., De carvalho, E. M., Abrantes, J. A., Nogueira, J. M. R. (2020). Buscando novos antimicrobianos: avaliação da atividade antimicrobiana de extratos de *Eugenia brasiliensis*. *Artigo original.* 52(3): 228-229.
- Mustafa, M-H *et al.* (2016). Antimicrobial susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa*

isolated from cystic fibrosis patients in northern Europe. *Antimicrob Agents Chemother.* v. 60, p. 6735-6741. DOI: 10.1128/AAC.01046-16.

➤ Naves, Plínio Lázaro Faleiro *et al.* (2013). Novas abordagens sobre os fatores de virulência de *Candida albicans*. *Revista de Ciências Médicas e Biológicas*, v. 12, n. 2, p. 229-233.

➤ Oliveira, B. (2015). **Bactéria *Pseudomonas sp.*** Disponível em: 2013. TCC CORPO - Cybele E. Autaciana (Salvo Automaticamente) 3 1.pdf (grupotiradentes.com). Acesso em: mar. 2022.

➤ Oliveira, C. S. D. (2015). Prospecção de compostos bioativos nas macroalgas *Himanthalia elongata*, *Laminaria ochroleuca* e *Undaria pinnatifida*. Tese de Mestrado. 9pp. Aveiro. Universidade de Aveiro.

➤ OPAS. (2022). Resistência antimicrobiana. **Paho.org**. Disponível em: <https://www.paho.org/pt/topicos/resistencia-antimicrobiana>. Acesso em: 18 de Maio de 2023.

➤ Pal A., Kamthania M.C., Kumar A. (2014). Bioactive Compounds and Properties of Seaweeds - A Review. *Open Access Libr J*.1:e752.

➤ Pereira L. (2009). Guia Ilustrado das Macroalgas: Conhecer e reconhecer algumas espécies da flora portuguesa. Imprensa da Universidade de Coimbra; 2009.

➤ Pereira L. (2010). Littoral of Viana do Castelo – ALGAE (Bilingue). Câmara Municipal de Viana do Castelo p. 68.

➤ Pereira, J. C. (2012). Avaliação do Potencial imunomodulador sobre o sistema complemento humano de frações de alga marinha *Bostrychia tenella* e de extratos de microorganismos endofíticos associados. **Dissertação de mestrado. Universidade de São Paulo.**

➤ Peres, L. S. (2016). Bioatividade de extratos aquosos de espécies de *Rubiacea* Juss. Sobre *Plutella xylostella* (Linneus, 1758) (Lepidoptera: Plutellidae) e determinação dos compostos fenólicos. Dissertação de mestrado. 34pp. Dourados-MS. Universidade Federal da Grande Dourados.

➤ Peso-Echarri, P. *et al.* (2012). Polissacáridos de algas como ingredientes funcionales en acuicultura marina: alginato, carragenato y ulvano. *Rev. biol. mar. oceanogr.* Valparaíso,

v.47, n. 3, p. 373-381.

➤ Pessoa, V. S. (2013). *Pseudomonas aeruginosa*: Epidemiologia e resistência a antimicrobianos em Hospital Universitário do Sudeste do Brasil. Tese de Mestrado. Uberlândia. Universidade Federal de Uberlândia.

➤ Pfaller MA, Diekema DJ. (2007). Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem. *Clin Microbiol Rev.* 20(1):133-63.

➤ Pfaller, M. A.; Diekema, D. J. (2007). Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem. *Clin Microbiol Rev* 20: 133–163.

➤ Plas RVD (2016). Candidíase oral: Manifestações Clínicas e Tratamento. Universidade Fernando Pessoa. Faculdade de Ciências da Saúde (Dissertação), Porto. 61p.

➤ Poirel, L.; Pitout, J.D.; Nordmann, P. (2007). Carbapenemases: molecular diversity and clinical consequences. *Future Medicine Ltd.*, v. 2, n. 5, p. 501–512. DOI: 10.2217/17460913.2.5.501.

➤ Poole, K., Srikumar, R. (2011). *Pseudomonas aeruginosa*: resistance to the max. *Front Microbiol.* v. 2, p. 65. DOI: 10.3389/fmicb.2011.00065.

➤ Pristov, K. E.; Ghannoum, M. A. (2019) Resistance of *Candida* to azoles and echinocandins worldwide. *Clinical Microbiology and Infection*, v. 25, n. 7, p. 792–798.

➤ Ramirez, A. V. G. (2017). A importância da microbiota no organismo humano e sua relação com a obesidade. *International Journal of Nutrology*, Catanduva-SP, v.10, n.4, p. 153-160.

➤ Ramsay, K.A. *et al.* (2016). Infection in cystic fibrosis: impact of the environment and climate. *Expert Review of Respiratory Medicine*. DOI: 10.1586/17476348.2016.116271.

➤ Rascaroli, Ana; Silva, Gislene; Valdameri, Gildete.(2009). **Foliculite e a depilação: sequelas, tratamentos e o papel do Tecnólogo em Cosmetologia e Estética.** Docplayer. Balneário Camboriú: [s. n.]. Disponível em: <https://docplayer.com.br/20567966-Artigo-cientifico-foliculite-e-a-depilacao-sequelas-tratamentos-e-o-papel-do-tecnologo-em-cosmetologia-e-estetica.html>. Acesso em: 11 dez. 2022.

➤ Reiner, Zeljko (2010). Combined therapy in the treatment of dyslipidemia. *Fundamental & Clinical Pharmacology*, Paris, v. 24, n. 1, p. 19-28.

➤ Ribeiro FC *et al.* (2019). Action mechanisms of probiotics on *Candida* spp. and

candidiasis prevention: an update. *Journal of Applied Microbiology*, 129: 175-185.

- Sameeh, M. Y., Mohamed, A. A., Elazzazy, A. M. (2016). Polyphenolic contents and antimicrobial activity of different extracts of *Padina boryana* Thivy and *Enteromorpha* sp. marine algae. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*. vol 6 (09): 88-91.
- Santos Jr, I. D., Souza, I. A. M., Borges, R.G., De Souza, L. B.S., De Santana, W. J., Coutinho, H. D. M. (2005). Características gerais da acção, do tratamento e da resistência fúngica ao fluconazol. *Scientia Medica*. v.15. n.3.189-193.
- Saraswati; *et al.* (2019). *Sargassum* Alga marinha como fonte de substâncias anti-inflamatórias e o potencial insight das espécies tropicais: uma revisão. *Mar Drugs*; v. 17; n. 10.
- Sardi, J. C. *et al.* (2013). “*Candida* species: current epidemiology, pathogenicity, biofilm formation, natural antifungal products and new therapeutic options” *Journal of Medical Microbiology*. V.62, p.10-24.
- Scharschmidt, TC & Fischbach, MA, (2013). “What lives on our skin: ecology, genomics and therapeutic opportunities of the skin microbiome” *Drug Discov. Today Dis. Mech* 10, e83–e89.
- Schwartz RA, Reynoso-Vasquez N, Kapila R. (2020). Chloronychia: The Goldman-Fox syndrome - implications for patients and healthcare workers. *Indian J Dermatol*. 65:1-4. doi: 10.4103/ijd.IJD_277_19.
- Selena. "***Pseudomonas* por infecção**". (2009). A infecção *Pseudomonas*: Medicina Pediatria e Medicina Geral.
- Seneviratne, C. J.; Jin, L.; Samaranayake, L. P. Biofilm lifestyle of *Candida*: a mini review. **Oral Dis**. 14:582-590, 2008.
- Silva, A. C. N. *et al.* (2016). Susceptibility testing of *Candida albicans* by disk diffusion method: A comparison of the culture media used. *Revista Brasileira de Análises Clínicas*, v. 48, n. 4.
- Silva, G. C. (2017). Extratos bioativos de algas marinhas da costa do Ceará: determinação de activiade contra o vírus da dengue e bactérias patogênicas resistentes a múltiplos antimicrobianos. Tese de doutoramento. 15pp. Fortaleza. Universidade Federal do Ceara.

- Silva, I. B. (2010). Algas marinhas. Programa de pós-graduação em Biodiversidade vegetal e meio ambiente. São Paulo. Instituto de Botânica.
- Silva, R. A., Oliveira, B. N. L., Silva, L. P. A., Oliveira, M. A., Chaves, G. C. (2020). Resistência a antimicrobianos: a formulação da resposta no âmbito da saúde global. *Saúde debate*. v. 44. n.126. 608pp.
- Simões , M. *et al.* (2016) Biotecnológica Das Microalgas. Algas Cultiváveis E Sua Aplicação Biotecnológica.
- Sivakumar, K.; Kannappan, S.; Dineshkumar, M.; Patil, K. P. (2014). Antagonism of marine macro alga *Kappaphycus alvarezii* extract against luminescence disease causing *Vibrio harveyi* during *Penaeus monodon* larviculture. *African Journal of Microbiology Research*, v. 8, p. 458-469.
- Soares MCST. (2005). Estudo de resistência aos antimicrobianos em amostras de *Pseudomonas aeruginosa* isoladas em hospitais da cidade de Niterói – RJ. [Dissertação] [Niterói]: Universidade Federal Fluminense; 78 f.
- Subedi, D. *et al.* (2018). Comparative genomics of clinical strains of *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from different geographic sites. *Sci Rep.*, v. 8, n. 1, p. 15668. DOI:10.1038/s41598-018-34020-7
- Talati, Ripple et al. (2010). The comparative efficacy of plant sterols and stanols on serum lipids: a systematic review and meta-analysis. *Journal of the American Dietetic Association*, Chicago. v. 110, n. 5, p.719-726.
- Tang, D. Y. Y., *et al.* (2020). Potential utilization of bioproducts from microalgae for the quality enhancement of Brazilian Journal of Development natural products. *Bioresource Technology*.
- Touil, Hidayat FZ *et al.* (2020). Optimum inhibition of amphotericin-B-resistant *Candida albicans* strain in single-and mixed-species biofilms by *Candida* and non-*Candida* terpenoids. *Biomolecules*, v. 10, n. 2, p. 342.
- Tronchin, E. M., & De Clerck, O. (2005). Brown Algae. In: De Clerck, O., J.J.Bolton, R. J. Anderson and E. Coppejans. Guide to the Seaweeds of Kwazulu-Natal. National Botanic Garden of Belgium, Brussels (Scripta Botanica Belgica), pp. 96-129.
- Valentin , Y. Y. (2010). Macroalgas Marinhas E Biotecnologia, Companheiras

Inseparáveis.

- Wallace, K. L.; Zheng, L.; Kanazawa, Y.; Shih, D.Q. (2014). Immunopathology of inflammatory bowel disease. *World J. Gastroenterol.* Pleasanton- CA, v. 20, n. 1, p. 6–21.
- Warnock, D. W. (2007). Trends in the Epidemiology of Invasive Fungal Infections. *Jpn. J. Med. Mycol.* Vol. 48, 1-12.
- Windels, E.M.; Michiels, J.E.; Bergh, B.; Fauvart, M. & Michiels, J. (2019). Antibiotics: Combatting tolerance to stop resistance. *American Society for Microbiology.* 10(5).
- Wisplinghoff, H.; Bischoff, T.; Tallent, S.M.; Seifert, H.; Weenzel, R. P. (2004). Nosocomial bloodstream infections in US hospitals: analysis of 24,179 cases from a prospective nationwide surveillance study. *Clin Infect Dis* 39: 309–317.
- World Health Organization. Antimicrobial Resistance fact sheets. What is antimicrobial Resistance? WHO. [acessado a 24 de Julho de 2021]. Disponível em: <https://www.who.int/features/qa175/en>
- Zavascki AP. (2003). Fatores de risco para aquisição de *Pseudomonas aeruginosa* resistente a imipenem em pacientes hospitalizados. [Dissertação] [Porto Alegre]: Universidade Federal do Rio Grande do Sul; 71f.

12. ANEXOS

12.1. Imagens representativas da macroalga *Padina boryana*

➤ Ilustração da macroalga *Padina boryana*.



Anexo 1: Fotografia da macroalga *P. boryana* depois de lavadas em água corrente para retirada de areia e epífitas. (Fonte: Autor).

➤ Ilustração das macroalgas trituradas.



Anexo 2: Fotografia da macroalga *P. boryana* triturada em um moinho até a obtenção de um pó fino. (Fonte: Autor).