



Faculdade de Ciências

Departamento de Ciências Biológicas

Licenciatura em Biologia Aplicada

Culminação de Estudos II

(Variante Investigação)

**Avaliação da Actividade Antimicrobiana de Extractos Metanólicos e Hexanólicos de Macroalgas *Caulerpa racemosa* e *Sargassum ilicifolium* Colectadas na Ilha de Inhaca, Província de Maputo**

**Autor**

Monteiro Avelina Tivane

Maputo, Outubro de 2024



Faculdade de Ciências

Departamento de Ciências Biológicas

Licenciatura em Biologia Aplicada

Culminação de Estudos II

(Variante Investigação)

**Avaliação da Actividade Antimicrobiana de Extractos Metanólicos e Hexanólicos de Macroalgas *Caulerpa racemosa* e *Sargassum ilicifolium* Colectadas na Ilha de Inhaca, Província de Maputo**

**Autor**

Monteiro Avelina Tivane

**Supervisora**

Prof<sup>a</sup>. Doutora Valera Dias

**Co – Supervisora**

Mestre Alice Manjate

Maputo, Outubro de 2024

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a Deus todo-poderoso, não apenas por me guiar nas tempestades académicas, mas por me dar a paciência e sabedoria para lidar com os erros e adversidades da vida. A minha família, meus tios, irmãos, primos, em especial aos meus queridos avós que com tantas dificuldades, eles sempre garantiram que eu tivesse uma educação, o vosso apoio incondicional, amor e incentivo foram essenciais para superar todos os desafios. O meu ser e estar é o reflexo da educação e amor que recebi de todos vós. Meu eterno agradecimento.

As supervisoras, Prof<sup>a</sup>. Dra. Valera Dias e Dra. Alice Manjate por embarcar comigo nessa jornada académica, pela prontidão, orientação, paciência e pelos conhecimentos enriquecedores transmitidos durante o percurso do trabalho e agradecer de forma muito especial a supervisora principal, a Prof<sup>a</sup>. Dra. Valera Dias por ter ajudado a ultrapassar qualquer dificuldade. Agradeço de igual forma ao dr. Samuel Simbine, que de forma compreensível e paciente, recebeu-me nas instalações laboratoriais do departamento de microbiologia, a sua orientação, acompanhamento e paciência foram valiosos para a realização dos ensaios microbiológicos. O meu muito obrigado.

Agradeço ao departamento de química, ao Prof. Dr. Eutlerio Chaúque em especial a mestre Atifa por terem concedido o uso de laboratório para realização da extracção dos compostos bioactivos e análises fitoquímicas. Ao Laboratório de Engenharia de Moçambique em especial ao Eng. Rodrigues e Eng<sup>a</sup>. Emília Duarte por terem concedido o uso do laboratório para o preparo e trituração das macroalgas e a todos técnicos e colegas do laboratório de microbiologia da Faculdade de Medicina, em especial ao grupo dos investigadores composto por dra. Esménia, dra. Ivete, mestre Rahma, dra. Marília, colegas Agar e Tivania, que sempre mostraram disponibilidade em ajudar e partilhar conhecimento, o meu muito obrigado.

Por último, expressar a minha gratidão a todos professores do DCB, que de forma directa ou indirecta contribuíram para a realização desse trabalho. Agradeço também, aos meus colegas do curso, que trilharam comigo nessa longa jornada académica e ajudaram-me a enriquecer os meus conhecimentos com as suas contribuições valiosas, em especial ao Rainel Mangraca e Dionísio Malieque e aos meus amigos companheiros da infância Andrade Matine, Paulo Siteo, António Pereira, Vasco Chongo e meu irmão Ercilio Tivane.

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

## **DECLARAÇÃO SOB COMPROMISSO DE HONRA**

Eu, Monteiro Avelina Tivane, declaro por minha honra que este trabalho de pesquisa é resultado do meu esforço pessoal e das orientações das minhas supervisoras. O seu conteúdo é original e todas fontes consultadas estão devidamente citadas no texto e nas referências bibliográficas. Declaro igualmente que este trabalho nunca foi apresentado em nenhuma outra instituição de ensino para a obtenção de qualquer grau acadêmico.

Maputo, Outubro de 2024

Autor

---

Monteiro Avelina Tivane

## **DEDICATÓRIA**

Dedico este trabalho aos meus pais, Joaquim Ernesto Cossa e Avelina César Tivane (*in memoriam*), aos meus queridos avós César Tivane e Lúcia Chilandza, aos meus irmãos, tios, sobrinhos, com todo o meu amor e gratidão, por tudo que sempre fizeram por mim ao longo da minha vida académica.

**Meu eterno agradecimento.**

## EPÍGRAFE

“O segredo da Sabedoria, do poder e do conhecimento é a humildade”.

Ernest Hemingway

## **LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E ACRÓNIMOS**

**UEM** - Universidade Eduardo Mondlane.

**CLSI** - Clinical Laboratory Standard Institute.

**OMS** - Organização Mundial de Saúde.

**FAO** - Food and agriculture Organization.

**GC-MS** - Cromatografia Gasosa Acoplado a espectrometria de Massa.

**NIST** - National Institute Standard and Technology.

**DCB** - Departamento de Ciências Biológicas.

**LEM** - Laboratório de Engenharia de Moçambique.

**TSA** - Teste de Sensibilidade Antimicrobiana.

**NaCl** - Cloreto de Sódio.

**UFC** - Unidade Formadora de Colónia.

**CIM** - Concentração Inibitória Mínima.

***C. albicans*** - *Candida albicans*.

***P. aeruginosa*** - *Pseudomonas aeruginosa*.

***S. aureus*** - *Staphylococcus aureus*.

***C. racemosa*** - *Caulerpa racemosa*.

***S. ilicifolium*** - *Sargassum ilicifolium*.

**µg** - Micrograma.

**µm** - Micrómetro.

**Split** - Repartido, Dividido.

**DP** – Desvio Padrão

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> - Número acumulativo de produtos naturais produzidos em diferentes classes de macroalgas entre o período de 1965 – 2012. ....	8
<b>Figura 2</b> - Espécie de macroalga <i>Caulerpa racemosa</i> . ....	10
<b>Figura 3</b> - Espécie de macroalga <i>Sargassum ilicifolium</i> . ....	12
<b>Figura 4</b> - Mecanismos de acção de antibióticos na célula procariótica. ....	17
<b>Figura 5</b> - Mecanismos de resistência aos antibióticos da célula procariótica. ....	18
<b>Figura 6</b> - Formação de biofilme. ....	19
<b>Figura 7</b> - Mapa mostrando a localização da ilha de Inhaca a cor vermelho Fonte: WGS. ....	25
<b>Figura 8</b> - Esquema ilustrativa de fluxograma de extracção de compostos bioactivos macerados por 24/48 horas. ....	28
<b>Figura 9</b> – Esquema ilustrativo de etapas seguidas desde a amostragem até a realização de análises fitoquímicas e ensaios microbiológicos. ....	29
<b>Figura 10</b> - Média ( $\pm$ DP) do halo de inibição de Actividade antimicrobiano dos extractos metanólicos e hexanólicos macerados por 24 h de duas espécies de macroalga frente a <i>S. aureus</i> . 1 - <i>C. racemosa</i> metanólico; 2 – <i>C. racemosa</i> hexanólico; 3 - <i>S. ilicifolium</i> metanólico; 4 – <i>S. ilicifolium</i> hexanólico. Vancomicina 30 $\mu$ g (controle positivo) e água destilada (Controlo negativo). ....	35
<b>Figura 11</b> - Média ( $\pm$ DP) do halo de inibição de actividade antimicrobiano dos extractos metanólicos e hexanólicos macerados por 48 h de duas espécies de macroalgas frente a bactéria <i>S. aureus</i> . 1 - <i>C. racemosa</i> metanólico; 2 – <i>C. racemosa</i> hexanólico; 3 - <i>S. ilicifolium</i> metanólicos; 4 - <i>S. ilicifolium</i> hexanólico. Vancomicina 30 $\mu$ g (controle positivo) e água destilada (Controlo negativo). ....	35

<b>Figura 12</b> – Representação dos resultados obtidos nos ensaios microbiológicos de extractos de macroalgas macerados por 48 horas frente a <i>S. aureus</i> .	36
<b>Figura 13</b> - Média ( $\pm$ DP) do halo de inibição de actividade antimicrobiano dos extractos metanólicos e hexanólicos macerados por 24 h de duas espécies de macroalga frente a bactéria <i>P. aeruginosa</i> . 1 - <i>C. racemosa</i> metanólico; 2 – <i>C. racemosa</i> hexanólico; 3 - <i>S. ilicifolium</i> metanólico; 4 - <i>S. ilicifolium</i> hexanólico. Imipinem 10 $\mu$ g (controle positivo) e água destilada (Controlo negativo).	37
<b>Figura 14</b> - Média ( $\pm$ DP) do halo de inibição de actividade antimicrobiano dos extractos metanólicos e hexanólicos macerados por 48 h de duas espécies de macroalga frente a bactéria <i>P. aeruginosa</i> . 1 - <i>C. racemosa</i> metanólico; 2 – <i>C. racemosa</i> hexanólico; 3 - <i>S. ilicifolium</i> metanólico; 4 - <i>S. ilicifolium</i> hexanólico. Imipinem 10 $\mu$ g (controle positivo) e água destilada (Controlo negativo).	38
<b>Figura 15</b> - Representação dos resultados obtidos nos ensaios microbiológicos de extractos de macroalgas macerados por 48 horas frente a <i>P. aeruginosa</i> .	38
<b>Figura 16</b> - Média ( $\pm$ DP) do halo de inibição de actividade antimicrobiano dos extractos metanólicos e hexanólicos macerados por 24 h de duas espécies de macroalga frente a bactéria <i>C. albicans</i> . 1 - <i>C. racemosa</i> metanólico; 2 – <i>C. racemosa</i> hexanólico; 3 - <i>S. ilicifolium</i> metanólico; 4 - <i>S. ilicifolium</i> hexanólico. Nistatina 100 $\mu$ g (controle positivo) e água destilada (Controlo negativo).	40
<b>Figura 17</b> - Representação dos resultados obtidos nos ensaios microbiológicos de extractos de macroalgas macerados por 24 horas frente a <i>C. albicans</i> incubado durante 72 horas.	40
<b>Figura 18</b> - Média ( $\pm$ DP) do halo de inibição de actividade antimicrobiano dos extractos metanólicos e hexanólicos macerados por 48 h de duas espécies de macroalga frente a bactéria <i>C. albicans</i> . 1 - <i>C. racemosa</i> metanólico; 2 – <i>C. racemosa</i> hexanólico; 3 - <i>S. ilicifolium</i> metanólico;	

4 - *S. ilicifolium* hexanólico. Nistitina 100 µg (controle positivo) e água destilada (Controlo negativo). ..... 41

**Figura 19** - Representação dos resultados obtidos nos ensaios microbiológicos de extractos de macroalgas macerados por 48 horas frente a *C. albicans* incubado durante 72 horas..... 41

**Figura 20** - Tempo de aquisição e estrutura química do composto fitoquímico 3,7,11,15 - Tetrametil-2-hexadecen-1-ol..... 43

**Figura 21** - Tempo de aquisição e estrutura química do composto fitoquímico Acetaldeído. .... 44

**Figura 22** - Tempo de aquisição e estrutura química do composto fitoquímico ácido hexadecanóico, ester metílico. .... 44

**Figura 23** - Tempo de aquisição e estrutura química do composto fitoquímico Neoftadieno. .... 45

## LISTA DE TABELAS

**Tabela 1** - Composição fitoquímica de extractos metanólicos de macroalgas de espécies *C. racemosa* e *S. ilicifolium* analisadas pelo método de GC-MS. .... 42

## RESUMO

A resistência antimicrobiana é um fenómeno crescente e desafiador para a indústria farmacêutica e a saúde pública em todo mundo, ameaçando no entanto, a eliminação e o controle de infecções causadas principalmente por bactérias e fungos. O tratamento prolongado e o diagnóstico inadequado de doenças infecciosas têm proporcionado ao surgimento de cepas microbianas cada vez mais resistentes aos antimicrobianos e mais virulentas. Em resposta, o presente estudo foi conduzido com vista a avaliar actividade antimicrobiana de extractos metanólicos e hexanólicos maceradas por 24 e 48 horas de macroalgas *Caulerpa racemosa* e *Sargassum ilicifolium* colectadas no Farol, Ilha de Inhaca frente as estirpes bacteriana *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* e fúngica *Candida albicans*. Aproximadamente 500g de macroalgas *C. racemosa* e *S. ilicifolium* foram colectadas, as macroalgas colectadas foram transportadas até ao laboratório B9, onde foram limpas e colocadas a secar na estufa natural durante 4 dias, onde em média a temperatura era de 40° C e posteriormente trituradas com recurso a um moinho eléctrico até obter o pó. Os extractos das macroalgas foram preparados usando dois solventes, metanol e n-hexano e, as soluções foram colocadas a macerar sob agitação á 180 rpm em dois tempos distintos (24 e 48 horas) e evaporados no rotavapor até obter 1.5 ml de extractos concentrados. As análises fitoquímicas foram realizadas no Departamento de Química da Faculdade de Ciências pela técnica de Cromatografia Gasosa de Espectro de Massa (GC-MS) e os ensaios microbiológicos foram realizados no laboratório de Microbiologia da Faculdade de Medicina da UEM, pela técnica de difusão em disco. As análises fitoquímicas dos extractos metanólicos de *C. racemosa* e *S. ilicifolium* realizadas, revelaram presença de 23 compostos fitoquímicos, incluindo, Neophytadiene, Acetaldeído, 3,7,11,15 - Tetrametil-2-hexadecen-1-ol e ácido hexadecanóico. O extracto metanólico de *C. racemosa* revelou maior diversidade de compostos fitoquímicos identificados com 18 compostos em relação aos extractos metanólicos de *S. ilicifolium* que apresentaram apenas 05 compostos. Os resultados dos ensaios microbiológicos, revelaram que os melhores resultados foram obtidos nos extractos metanólicos de *C. racemosa* macerados por 48 horas pois inibiram o crescimento de todas cepas microbianas testadas nesse estudo, nomeadamente: *S. aureus*, *P. aeruginosa* e *C. albicans*.

**Palavras-chave:** Macroalgas, compostos bioactivos, actividade antimicrobiana, resistência antimicrobiana.

## Índice

<b>AGRADECIMENTOS.....</b>	<b>i</b>
<b>DECLARAÇÃO SOB COMPROMISSO DE HONRA.....</b>	<b>ii</b>
<b>DEDICATÓRIA.....</b>	<b>iii</b>
<b>EPÍGRAFE.....</b>	<b>iv</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E ACRÓNIMOS.....</b>	<b>v</b>
<b>LISTA DE FIGURAS.....</b>	<b>vi</b>
<b>LISTA DE TABELAS.....</b>	<b>viii</b>
<b>RESUMO.....</b>	<b>ix</b>
<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>1</b>
1.1. Problema.....	3
1.2. Justificativa.....	4
1.3. Objectivos.....	5
1.4. Hipóteses.....	6
<b>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>7</b>
2.1. Macroalgas Marinhas.....	7
2.2. Classe <i>Chlorophyta</i> .....	9
2.3. Classe <i>Phaeophyta</i> .....	10
2.4. Metabólitos Secundários.....	12
2.5. Compostos fenólicos.....	12
2.6. Agentes antimicrobianas.....	15
2.7. Mecanismo de acção de agentes antibacterianos.....	15
2.8. Mecanismos de resistência bacteriana.....	17
2.9. Descrição dos microorganismos testados.....	19
2.10. <i>Staphylococcus aureus</i> .....	19
2.11. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	21
2.12. <i>Candida albicans</i> .....	22
2.13. Polaridade dos solventes.....	24
<b>3. ÁREA DE ESTUDO.....</b>	<b>25</b>
<b>4. MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>26</b>

4.1.	Material não Biológico.....	26
4.2.	Material Biológico: .....	26
4.3.	Amostragem.....	27
4.4.	Extracção de compostos bioactivos de macroalgas.....	27
4.5.	Ensaio da actividade antimicrobiana dos extractos metanólicos e hexanólicos de macroalgas macerados por 24 e 48 horas.....	30
4.6.	Avaliação da actividade antimicrobiana .....	30
4.7.	Cromatografia gasosa de espectro de massa (GC-MS).....	32
4.8.	Análise de dados .....	33
<b>5.</b>	<b>RESULTADOS .....</b>	<b>34</b>
<b>6.</b>	<b>DISCUSSÃO.....</b>	<b>46</b>
6.1.	Actividade antimicrobiana de extractos metanólicos e hexanólicos de <i>C. racemosa</i> e <i>S. ilicifolium</i> .....	46
6.2.	Actividade antimicrobiana de extractos de <i>C. racemosa</i> e <i>S. ilicifolium</i> macerados por 24 e 48 horas	48
6.3.	Compostos fitoquímicos dos extractos metanólicos de <i>C. racemosa</i> e <i>S. ilicifolium</i> .....	49
<b>7.</b>	<b>CONCLUSÃO .....</b>	<b>52</b>
<b>8.</b>	<b>LIMITAÇÕES.....</b>	<b>53</b>
<b>9.</b>	<b>RECOMENDAÇÕES.....</b>	<b>54</b>
<b>10.</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>55</b>
<b>11.</b>	<b>ANEXOS.....</b>	<b>62</b>

## 1. INTRODUÇÃO

Os ecossistemas aquáticos são ricos e muito complexos, estes são compostos por uma grande diversidade de organismos o qual ainda não é conhecido no seu todo, dispõe também de uma grande diversidade de habitats que controlam a presença e as respostas dos outros organismos (Pimentel *et al.*, 2018). As macroalgas são organismos muito diversificados comparativamente a outros organismos marinhos. Estes organismos podem ser encontrados em diversidades ambientes marinhos como, nas zonas rochosas, zona entre marés, levados pelas praias e como gigantescas florestas subaquáticas (Al-Hashdy *et al.*, 2022).

As macroalgas apresentam uma elevada plasticidade, quer fisiológica ou morfológica, essas características conferem-lhes alta adaptação á variações extremas que ocorrem no ambiente marinho, permitindo a sua sobrevivência e a produção de diversidades compostos metabólitos secundários. Essa característica é considerada como única desses organismos, tornando-as candidatas perfeitas para a triagem de novos compostos bioactivos com o potencial biotecnológico (Pinteus *et al.*, 2018). Os compostos metabólitos secundários são aplicados no desenvolvimento de vários produtos com diferentes funções, por serem ricos em compostos biologicamente activos como é o caso dos terpenóides, carotenóides, tocoferóis e polifenóis. Esses compostos são promissores para a indústria farmacêutica (Dias *et al.*, 2020).

As macroalgas das classes *Chlorophyta*, *Phaeophyta* e *Rhodophyta* têm chamado atenção para os pesquisadores devido a produção dos compostos bioactivos com propriedades farmacológicas (Kolanjinathan, 2014). Em Moçambique são encontradas diversas espécies de macroalgas, na ilha de Inhaca, principalmente na ponta Mazondué são encontradas espécies como *Gracilaria spp*, *Halimeda cuneta*, *Padina boryana*, *Sargassum spp*, *Caulerpa racemosa*, e outras (Bandeira, 2002).

Compostos bioactivos de certas espécies de macroalgas possuem capacidade de inibir o crescimento de bactérias Gram negativas e Gram positivas tornando deste modo, candidatas perfeitas para a triagem de novas drogas com potencial actividade antimicrobiana (Kolanjinathan, 2014). No contexto em que, o número de casos de infecções bacterianas, principalmente em ambientes hospitalares está cada vez a aumentar em todo mundo por conta da resistência antimicrobiana (Preziosi *et al.*, 2015). Por outro lado, as infecções fúngicas também

emergiram nas últimas décadas como uma das principais causas de infecções humanas e esse aumento pode ser atribuído a resistência que esses fungos vêm adquirindo e ao número em constante crescimento de indivíduos imunologicamente comprometido por uma determinada doença ou indivíduos submetidos a procedimentos cirúrgicos invasivos (Murray *et al.*, 2009).

Os microorganismos estão intimamente associados com a espécie humana, em relações simbióticas assim como maléficas, causando lhe várias doenças, portanto, apesar da evolução da tecnologia na área da medicina, as doenças infecciosas causadas principalmente por bactérias e fungos ainda constituem uma ameaça a saúde pública devido ao surgimento cepas microbianas resistentes aos agentes antimicrobianos (De Sousa, 2017).

A resistência aos agentes antimicrobianos é um fenómeno muito antigo e crescente em todo mundo, levando a emergência de cepas microbianas cada vez mais resistentes aos agentes antimicrobianos e virulentas (Monteiro *et al.*, 2015). Portanto, as macroalgas são consideradas como um dos grandes reservatórios naturais de compostos biologicamente activos para a triagem de novas drogas com potenciais aplicações farmacológicas capazes de combater esses microorganismos resistentes aos agentes antimicrobianos (Fithriani, 2015).

Os estudos de macroalgas em Moçambique ainda são escassos, apesar de Moçambique apresentar uma grande biodiversidade de macroalgas com maiores costas em toda África com aproximadamente 2.800 km. As pesquisas que rotineiramente são realizadas, estão relacionadas com a taxonomia e biogeografia das macroalgas na zona sul do país (Carvalho e Bandeira 1998). Os estudos relacionados com a triagem dos compostos fitoquímicos e suas aplicações biotecnológicas ainda são bastante escassos (Dias *et al.*, 2020).

O presente estudo teve como objectivo, avaliar actividade antimicrobiana de extractos metanólicos e hexanólicos de duas espécies de macroalgas *Caulerpa racemosa* e *Sargassum ilicifolium* colectadas na Ilha de Inhaca, Província de Maputo.

## **1.1. Problema**

O fenómeno de resistência antimicrobiana emergiu entre os problemas de saúde pública mais preocupante e desafiador do século, ameaçando o sucesso da terapia antimicrobiana e crescente, o número de casos de doenças infecciosas associadas principalmente a bactérias e fungos. Todavia, o desenvolvimento dos novos padrões de resistência desses patógenos, representam uma ameaça global a eliminação de doenças infecciosas devido a ineficiência dos agentes antimicrobianos que tornam a terapia antimicrobiana cada vez mais desafiadora para o sistema de saúde (Ye *et al.*, 2020). Por outro lado, o acesso aos agentes antimicrobianos é limitado devido ao alto custo financeiro e ainda, há relatos de toxicidade relacionada com alguns desses agentes antimicrobianos (Cruz *et al.*, 2023).

As doenças infecciosas são as principais causadoras de morbidade e mortalidade no mundo, estimando-se em cerca de 4,95 milhões de óbitos registadas apenas no em 2019 no estudo realizado em 204 países de todo mundo, sendo que 1.27 milhões de mortes estão directamente relacionadas com resistência aos agentes antimicrobianos, para além da preocupação das infecções bacterianas que aumentam exponencialmente a cada dia, as infecções fúngicas invasivas também estão progressivamente aumentando em todo mundo devido a resistência que esses fungos vêm adquirindo, principalmente em indivíduos com o sistema imunológico comprometido. O outro factor desafiador e preocupante é o diagnóstico das infecções fúngicas, pois muitos sintomas não são específicos e podem ser semelhantes com outras condições (FAO, 2020 e Araújo *et al.*, 2023).

Segundo as previsões da OMS, o número de óbitos causados por doenças infecciosas pode aumentar exponencialmente até atingir 10 milhões de mortes, e a economia global perderá cerca de 100 bilhões de dólares até 2050, caso não sejam investigadas novas fontes de agentes antimicrobianos mais eficazes e melhoramento de serviços básicos de saúde, agravando ainda mais o actual problema de saúde pública, principalmente em países da África subsaariana (FAO, 2020).

Assim sendo, será que existe diferenças entre a actividade antimicrobiana dos extractos metanólicos e hexanólicos das macroalgas *Caulerpa racemosa* e *Sargassum ilicifolium*, macerados por 24 e 48 horas?

## 1.2. Justificativa

Desde a descoberta do primeiro antibiótico, penicilina em 1928 por Alexandre Fleming, o uso indiscriminado de agentes antibacterianos tem causado sérias implicações para a terapia antibacteriana. A administração não adequada é um dos precursores do desenvolvimento de cepas microbianas resistentes aos agentes antimicrobianos, causando uma selecção natural na população microbiana resultante da exposição desses agentes antimicrobianos. O surgimento de resistência antibacteriana tem estimulado a busca de novas fontes de agentes antimicrobianos (De Sousa, 2017). A resistência bacteriana é classificada pela OMS como uma prioridade global para impulsionar mais investigações e intervenções, de modo a reforçar a resposta a infecções e a resistência bacteriana. No entanto, em 2017, a OMS estabeleceu uma lista prioritária de bactérias resistentes, algumas das bactérias apontadas nessa lista fazem parte do presente estudo, nomeadamente *S. aureus* e *P. aeruginosa* (FAO, 2020). Por outro lado, em 2022, a OMS publicou pela primeira vez a lista de fungos patogénicos prioritários e emergentes, dentro dessa perspectiva, um dos fungos patogénicos mais prioritários e críticos citados foi *Candida albicans*, que por sinal faz parte do presente estudo (OMS, 2022).

Para além da ineficiência dos agentes antimicrobianos devido a resistência antimicrobiana, alguns desses antimicrobianos apresentam toxicidade e efeitos colaterais quando administrados. A busca de novas drogas naturais, mais eficazes, menos tóxicas, com menos efeitos colaterais, sinergia e capacidade de combater bactérias e fungos virulentas e resistentes aos agentes antimicrobianos é imprescindível para a indústria farmacêutica. As macroalgas *Caulerpa racemosa* e *Sargassum ilicifolium* são ricos em compostos bioactivos com actividade antimicrobiana, antioxidante e citotóxica (Ye *et al.*, 2020).

O estudo visa dar continuidade aos estudos já realizados sobre avaliação da actividade antimicrobiana de extractos metanólicos das macroalgas *Caulerpa racemosa* e *Sargassum ilicifolium*, introduzindo uma nova abordagem. O presente estudo fornecerá informações científicas locais sobre o melhor solvente, entre o metanol e n-hexano, para a extracção de compostos bioactivos com actividade antimicrobiana. Além disso, o estudo avaliará o tempo de maceração necessária para otimizar a extracção dos compostos bioactivos nessas duas espécies de macroalgas colectadas na Ilha de Inhaca.

### **1.3. Objectivos**

#### **1.3.1. Geral**

- Avaliar actividade antimicrobiana de extractos metanólicos e hexanólicos de macroalgas *Caulerpa racemosa* e *Sargassum ilicifolium* frente as estirpes bacteriana *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* e fúngica *Candida albicans*.

#### **1.3.2. Específicos**

- Comparar a actividade antimicrobiana de extractos (**metanólicos e hexanólicos**) de macroalgas *C. racemosa* e *S. ilicifolium*, através dos diâmetros dos halos de inibição;
- Comparar a actividade antimicrobiana dos extractos de macroalgas *C. racemosa* e *S. ilicifolium* macerados em dois tempos (**24 e 48 horas**), através dos diâmetros dos halos de inibição.
- Identificar os compostos fitoquímicos nos extractos metanólicos de *Caulerpa racemosa* e *Sargassum ilicifolium* pela técnica de cromatografia gasosa de espectro de massa (GC-MS).

## **1.4. Hipóteses**

### **1.4.1. Nula**

- Não há diferenças significativas nos diâmetros dos halos de inibição dos extractos metanólicos e hexanólicos de macroalgas *Caulerpa racemosa* e *Sargassum ilicifolium*.
- Não há diferenças significativas nos diâmetros dos halos de inibição dos extractos de macroalgas *Caulerpa racemosa* e *Sargassum ilicifolium* macerados em dois tempos (24 e 48 horas).

### **1.4.2. Alternativa**

- Há diferenças significativas nos diâmetros dos halos de inibição dos extractos metanólicos e hexanólicos de macroalgas *Caulerpa racemosa* e *Sargassum ilicifolium*.
- Há diferenças significativas nos diâmetros dos halos de inibição dos extractos de macroalgas *Caulerpa racemosa* e *Sargassum ilicifolium* macerados em dois tempos (24 e 48 horas).

## **2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

### **2.1. Macroalgas Marinhas**

Macroalgas são organismos multicelulares, macroscópicas, eucarióticos e autotróficos que podem ser marinhos ou de água doce (Pinteus *et al.*, 2018). Estes organismos constituem o componente primário, ocupando o primeiro nível da cadeia alimentar no ambiente aquático, sendo as macroalgas as maiores estratificadas ou filamentosas, que podem formar grandes florestas aquáticas que servem de alimento e abrigo para a sobrevivência de diversidades espécies de organismos aquáticos como animais invertebrados e vertebrados. As macroalgas são responsáveis pela produção primária da matéria orgânica e energia, na qual dependem os demais organismos na cadeia alimentar para a sua sobrevivência. Como produtores primários, as macroalgas absorvem nutrientes dissolvidos em água para o seu crescimento e desenvolvimento e absorve o dióxido de carbono CO<sub>2</sub> dissolvido em água como matéria-prima para produção de matéria orgânica através dos processos fotossintéticos (Fajardo e Cornejo, 2020).

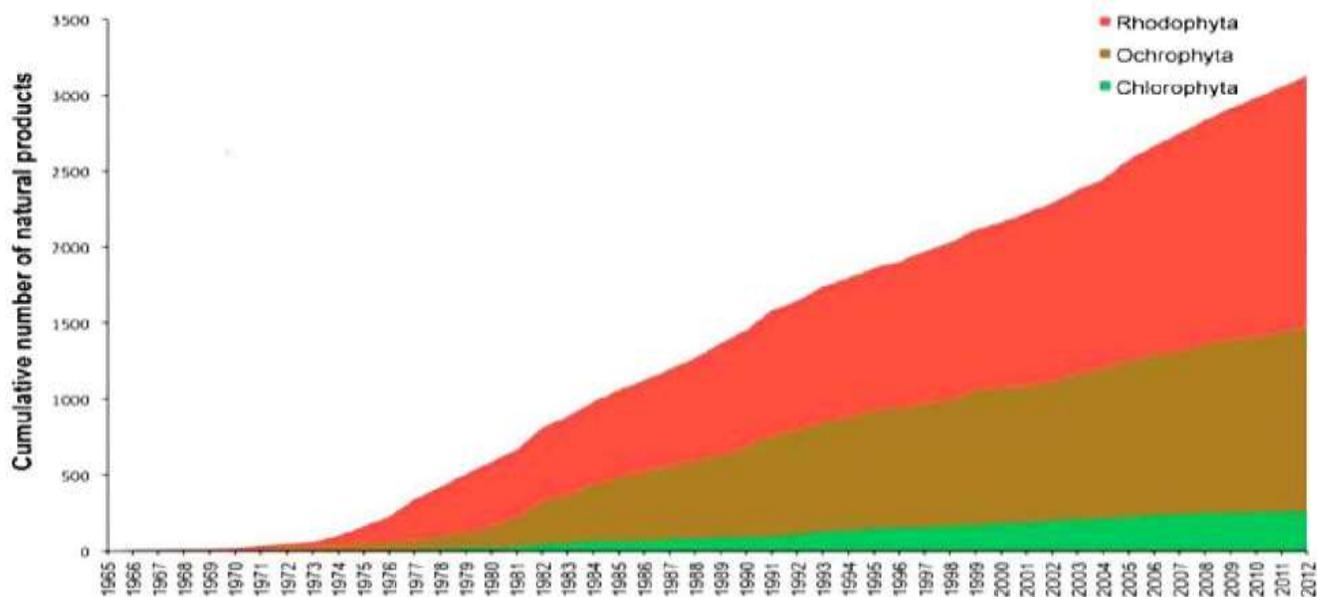
No ambiente marinho, as macroalgas competem pela luz, nutrientes e pelo espaço, para além da necessidade de dióxido de carbono e água para a produção da matéria-orgânica, as macroalgas e plantas produzem os mesmos compostos de armazenamento e usam as mesmas estratégias de defesa contra colonizadores e predadores no ambiente aquático. Esses organismos desenvolveram mecanismos eficazes para a sua sobrevivência contra ameaças bióticas, como colonização por bactérias, vírus e fungos. Esses organismos são eficientes para produção de uma vasta gama de compostos biologicamente activos, essa capacidade é devido a sua grande diversidade ecológica e a capacidade de adaptação em condições diversas até mesmo extremas (Al-Hashdy, 2022).

As macroalgas distribuem-se desde a zona entre maré até zonas mais profundas, com cerca de 100 metros de profundidade de acordo com as necessidades de obtenção de luz, onde os raios penetram, nestes ambientes as macroalgas ficam aderidas em substratos para evitar que sejam levados pelas correntes de água. *Phaeophyta* e *Chlorophyta* são classes de macroalgas mais abundantes em águas rasas, pois esse grupo depende maioritariamente da incidência de luz que é um factor determinante para o seu crescimento e desenvolvimento. A classe *Rhodophyta* é mais encontrada em maiores profundidades (Fajardo e Cornejo, 2020).

Em Moçambique, na zona sul do país são mais predominantes as macroalgas castanhas e verdes enquanto na zona norte do país há maior predominância de macroalgas vermelhas (*Rhodophyta*) (Hoguane, 2007).

### 2.1.1. Cultivo e aplicações de macroalgas

O cultivo e o uso de macroalgas vêm aumentando gradualmente em todo mundo, inclusive em Moçambique. Os produtos naturais por eles produzidos são de grande valor económico em várias indústrias como a farmacêutica, cosmética e alimentar (Figura 1). A medida que o seu interesse, cultivo e aplicações de macroalgas aumentam, o seu valor no mercado também aumenta exponencialmente (Martins, 2014).



**Figura 1** - Número acumulado de produtos naturais produzidos em diferentes classes de macroalgas entre o período de 1965 – 2012.

## **2.2. Classe Chlorophyta**

As algas pertencentes a essa classe, são unicelulares e multicelulares autotróficas, elas apresentam clorofila a e b, e tem amido como reserva de alimento. Podem habitar em ambientes de água doce, áreas marinhas costeiras e terrestres. Neste grupo de macroalgas encontramos um grupo responsável pela produção de oxigénio molecular. Além da sua habilidade de sobreviver em condições adversas como é o exemplo do género *Ulva* e *Enteromorpha* (Granham *et al.*, 2009). Existe variedades espécies de macroalgas verdes em Moçambique, sendo mais predominantes na zona sul do país. As espécies mais encontradas são, *Halimeda opuntia*, *Halimeda incrassata*, *Caulerpa racemosa*, *Sargassum spp* e *Codium spp* (Dias *et al.*, 2020).

### **2.2.1. Espécie Caulerpa racemosa**

A *Caulerpa racemosa* é uma alga verde com talo verde-claro, apresenta aproximadamente 7,1 cm de altura. É geralmente encontrado fixo ao substrato por ramos rizóides cilíndricos, densamente ramificados, translúcidas ou amarelados, com 0,2 – 0,9 de comprimento. Apresentam estolão cilíndrico, glabro e ramificado. Ramos assimiladores cilíndricos, com 2,7 – 5,4 cm de altura e 0,7 – 10,2 mm de largura. Râmulos sustentados por pedúnculos curtos, ápice globoso, dispostos radialmente no ramo assimilador, com 0,6 – 8 cm de comprimento e 0,5 – 1,2 mm de diâmetro (Figura 2), (Carneiro *et al.*, 2019).

Esta espécie encontra-se distribuída em águas marinhas tropicais e semitropicais entre marés e intra marés. Por conta do seu habitat na zona entre marés, essa espécie é periodicamente exposta a vários tipos de estresses ambientais como, exposição aos raios UV, salinidade, limitação de nutrientes, disponibilidade de luz excessiva e dessecação, em respostas a esses factores stressantes que o meio cria, essa espécie produz vários compostos biologicamente activos (Mehra, 2019).

Vários compostos metabólitos secundários são produzidos por essa espécie, dentre eles destacam, Caulerpino que é um alcalóide de cor vermelha composto por duas porções fundidas formando um diester com fórmula molecular ( $C_{24}H_{18}N_2O_4$ ). Esse composto exhibe actividade

antimicrobiana, anti-inflamatória e antitumoral, devido a sua eficácia e baixa toxicidade é considerada como um potencial composto farmacológico (Mehra, 2019).

Por outro lado, a Caulerpenina é um composto bioactivo isolado de *Caulerpa racemosa*, este apresenta a fórmula  $C_{12}H_{26}O_6$ , é um composto acíclico que apresenta 3 grupos acetoxi, esse composto apresenta propriedades antibacterianas, antiproliferativas, citotóxica e antifúngica (Padilha, 2014).



**Figura 2** - Espécie de macroalga *Caulerpa racemosa*.

### **2.3. Classe *Phaeophyta***

As macroalgas pertencentes a esta classe, apresentam coloração acastanhada e possuem clorofilas a e b. Os seus cloroplastos são constituídos por vários carotenóides incluindo uma grande quantidade de fucoxantina, uma xantofila presente em seus cloroplasto, que mascara a clorofila e proporciona a sua coloração característico. Essas algas dominam os costões rochosos e variam em tamanho, podendo ser microscópicas até atingir maiores tamanhos como é o caso dos *Kelps* (Rave *et al.*, 2007).

As macroalgas castanhas são encontradas em regiões polares, temperadas e ricas em nutrientes, elas podem apresentar grande produção primária, podendo apresentar estruturas desde as filamentosas até as gigantes macroalgas, os chamados *Kelps*, principalmente dos géneros *Laminaria* e *Macrocystes*. Em regiões tropicais e subtropicais são abundantes as algas do

pequeno porte como é o caso de espécies o género *Sargassum spp*, *Padina* e *Dictyota* (Pereira e Soares-Gomes, 2021).

### **2.3.1. Espécie *Sargassum ilicifolium***

*Sargassum* C. Agardh é um dos géneros mais diversificados, complexos e amplamente distribuídos da classe *Phaeophyta* (Al-Hashdy *et al.*, 2022). As espécies pertencentes a essa classe de macroalgas podem ser encontradas em oceanos Atlântico e Indico, incluindo habitats temperados, subtropicais e tropicais. Devido a sua predominância nesses habitats, a sua biomassa é disponível para exploração biotecnológica como produção de fármacos, cosméticos e outras aplicações (Thalasia, 2022).

A *Sargassum ilicifolium* apresenta talo cilíndrico resistente e apresenta uma altura que varia de 15 – 20 cm de altura. Apresenta ramos primários lisos compridos, ramos secundários também levemente compridos e lisos, dispostos irregularmente no ramo primário. Apresentam filóides com 1 - 3 cm de comprimento e 8 – 15 mm de largura, com dentes marginais de tamanhos variados e nervura central o qual desaparece gradualmente na fase de crescimento em direcção ao ápice, apresentam receptáculos achatados com espinhos e um pedicelo ramificado (Figura 3) (Oliveira *et al.*, 2005).

As macroalgas do género *Sargassum*, incluindo a espécie *S. ilicifolium*, produzem uma vasta gama de metabólitos secundários com propriedades farmacológicas como actividade antibacteriana, antifúngica, antioxidante entre outras. Os principais metabólitos presentes são: Ácidos graxos, esteróides, esteróis e florotaninos (Thalasia, 2022).



**Figura 3** - Espécie de macroalga *Sargassum ilicifolium*.

## **2.4. Metabólitos Secundários**

As macroalgas são organismos sésseis que evoluíram para sobreviver a diversas condições ambientais e estresses abióticos diversos, extremas e hostis, como mudanças de temperatura, salinidade, exposição a raios UV. Para além de estresse abióticos, esses organismos estão expostos ao estresse biótico como, competição, predação, colonização, essas condições do estresses possibilitam a produção de uma vasta gama de compostos biologicamente activas como, pigmentos, vitaminas, compostos fenólicos, flavonóides, taninos, esteróis e outros compostos biologicamente activas, muitas delas com propriedades farmacológicas. Além destes, produzem aminoácidos, proteínas, ácidos graxos saturados e insaturados, e muitos outros tipos de polissacáridos que estão intimamente ligadas ao crescimento, desenvolvimento e reprodução das macroalgas (Do Nascimento *et al.*, 2022). Muitos desses metabólitos secundários apresentam actividade antibacteriana, antifúngica e outras actividades biológicas (Thalisa, 2022).

## **2.5. Compostos fenólicos**

Os compostos fenólicos são metabólitos secundários provenientes de plantas, são sintetizadas em resposta a condições de estresse. Podem agir como fitoalexinas, como atractivo para a polinização, ou contribuir para a pigmentação do vegetal, como alelopático e inibe o crescimento de outros organismos e microorganismos competidores, actuando como antioxidante,

antibacteriano, antifúngico e etc. (Cruz, 2013). Esses compostos são constituintes da estrutura de proteína, alcalóides, terpenos, flavonóides, estilbenos, cumarinas e taninos, esses são representantes dos compostos fenólicos, o qual são considerados como os mais numerosos dos metabólitos secundários dos vegetais (Silva *et al.*, 2010).

### **2.5.1. Flavonóides**

São considerados como um dos principais grupos fenólicos, os flavonóides são abundantemente encontrados maioritariamente em organismos vegetais, os quais desempenham funções de defesa contra radiações UV, acção dos insectos, vírus, bactérias, oxidação das células vegetais para além dessas funções, esses compostos participam na regulação hormonal dos vegetais e inibidores de enzimas (De Sousa, 2017). Esses compostos exibem uma vasta gama de actividades biológicas dentre elas destacam, actividade antioxidante, antialérgica, anti-inflamatória, antiviral, antimicrobiana e insecticida (Fernando, 2021).

### **2.5.2. Taninos**

São compostos fenólicos complexos, solúveis em água e massa molecular variando de 500 a 3.000 Daltons, os taninos podem ser divididos em dois grupos, os taninos condensados e taninos hidrossolúveis. O interesse actual de taninos está relacionada com a prevenção de certas doenças, estes compostos bioactivos tem a capacidade de complexar proteínas, polissacarídeos e quelar os metálicos que seriam os mecanismos de acção fungicida e bactericida, por impedir a acção de algumas enzimas importantes ou mesmo inactiva-las pela ausência de cofactor (Cowan, 1999). A actividade biológica desses compostos pode ser explicada devido a formação de complexos com outras moléculas, principalmente com proteínas e polissacarídeos (Monteiro *et al.*, 2005).

### **2.5.3. Saponinas**

São compostos biologicamente activos que ocorre especialmente no reino vegetal, elas são muito estudadas devido as suas propriedades farmacológicas que apresentam actividade antimicrobiana, antidiabética, anti-HIV, anti-inflamatória, hemolítica e outras. Esses compostos bioactivos são produzidos nos tecidos vegetais mais vulneráveis aos ataques fúngicas, bacterianas ou ataques pelos insectos, actuando como substâncias protectoras do tecido da planta (Pereira e Do Nascimento, 2014).

### **2.5.4. Alcalóides**

Alcalóides são compostos naturais biologicamente activas, esses compostos são mais encontrados em plantas angiospérmicas com carácter alcalino. As plantas que produzem esse composto são normalmente evitadas por insectos em sua dieta, devido a sua característica de toxicidade ou pelo facto de muitos alcalóides apresentarem um gosto amargo. Esses compostos desempenham também o papel de defesa contra microorganismos como, vírus, bactérias e fungos, protecção contra radiação ultravioleta, devido a presença de compostos aromáticos altamente absorventes a radiação ultravioleta (Pereira e Do Nascimento, 2014).

### **2.5.5. Esteróides**

Esteróides são compostos que na sua estrutura apresentam ciclopentano-peridro-fenantreno. Devido a sua estrutura química, esses compostos apresentam solubilidade em gorduras (lipossolúveis) e contem 17 carbonos na sua estrutura dispostos em quatro anéis ligados entre si. Esses compostos apresentam propriedades farmacológicas como, anti inflamatórias, antibacteriana e antifúngica (Fernando, 2021).

## **2.6. Agentes antimicrobianas**

Os agentes antimicrobianos podem agir nas bactérias patogénicas interrompendo o seu crescimento e reprodução (efeito bacteriostático), podem eliminar as bactérias mas não as células hospedeiras (efeito bactericida) ou podem induzir a morte celular por lise (efeito bacteriolítico), levando a diminuição do número de células viáveis no hospedeiro. Exemplos de antibióticos bacteriolíticos são antibióticos que inibem a síntese da parede celular como é o caso da penicilina (João, 2015).

## **2.7. Mecanismo de acção de agentes antibacterianos**

Os agentes antimicrobianos podem agir nas células bacterianas através dos seguintes mecanismos de acção: Acção sobre a síntese dos ácidos nucleicos, inibição da síntese proteica, acção sobre a membrana plasmática (Figura 4).

### **2.7.1. Acção antibiótica sobre a parede celular**

A parede celular de bactéria consiste em uma rede de macromoléculas denominadas peptidoglicano, esta estrutura confere rigidez e controla a pressão osmótica do citoplasma bacteriana. Os antibióticos como a penicilina, inibem a síntese dessa estrutura causando enfraquecimento e lise celular da bactéria. Sendo que a penicilina age sobre o processo de síntese, somente células que estejam crescendo activamente são afectadas por esses antibióticos, devido ao facto de que as células humanas não possuem células constituídas por peptidoglicano, esses antibióticos não causam nenhum dano nas células humanas (Tortora, 2012).

### **2.7.2. Acção antibiótica sobre a síntese dos ácidos nucleicos**

Antibióticos como as quinolonas, apresentam actividade bactericida que resulta na inibição do DNA girase ou topoisomerase II, enzima que desempenha a função de compactação e activação da molécula de DNA, esse fenómeno é essencial para a replicação e transcrição do DNA da

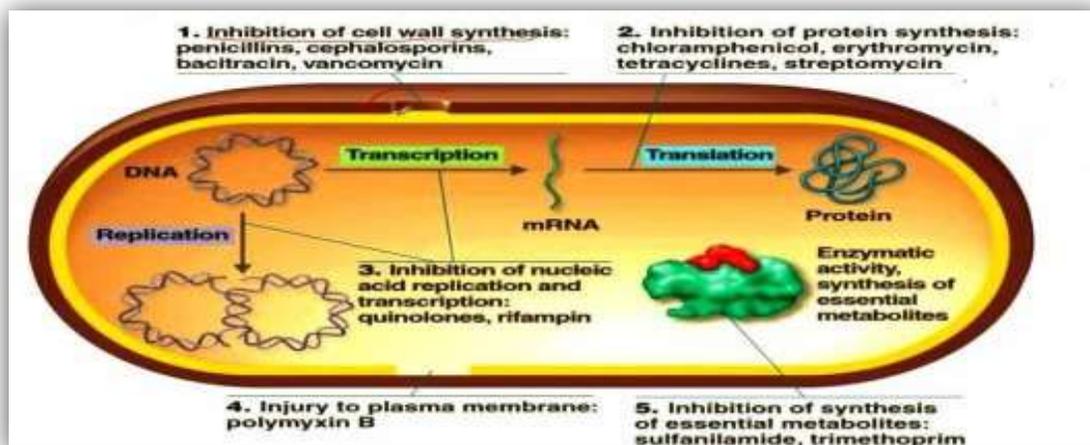
bactéria. A inibição dessa enzima impede a duplicação do DNA, tornando deste modo, a sua estrutura tridimensional modificada, esse processo provoca a síntese descontrolada de proteínas, o que resultará a acção bactericida do antibiótico (Dos Santos, 2018).

### **2.7.3. Inibição da síntese proteica**

A síntese proteica é comum em todos os organismos, queira eucarióticas ou procarióticas. Esse processo pode ser interrompido pelos antibióticos nas células procarióticas, que ocorre nas células procarióticas devido a diferença entre estruturas ribossómicas das células, as células eucarióticas possuem estrutura 80S e as células procarióticas 70S. Essa diferença estrutural é a razão da toxicidade selectiva dos antibióticos que interferem a síntese proteica dos organismos procarióticos. Alguns desses antibióticos são clorafenicol, eritromicina (Tortora, 2012).

### **2.7.4. Acção antimicrobiana sobre a membrana plasmática**

Antibióticos compostos por polipeptídeos, induzem mudanças na permeabilidade da membrana plasmática, essas mudanças causam a perda de metabólitos vitais da célula bacteriana. Certos antifúngicos, como anfotericina B, o miconazol e o cetoconazol, são altamente eficientes contra uma vasta gama de infecções fúngicas. Essas drogas combinam com esteróis na membrana plasmática dos fungos e danificam a sua membrana plasmática. Sendo que, as membranas plasmáticas bacterianas geralmente não possuem esteróis, a sua membrana não é danificada (Henriques *et al.*, 2013).



**Figura 4** - Mecanismos de acção de antibióticos na célula procariótica.

## **2.8. Mecanismos de resistência bacteriana**

As bactérias podem agir contra os antimicrobianos através dos seguintes mecanismos: Produção de enzimas que degradam ou modificam o antibiótico, enzimas que alteram o antibiótico, Sistema de efluxo do antibiótico e formação de biofilme (Figura 5 e Figura 6).

### **2.8.1. Produção de enzimas que degradam ou modificam o antibiótico**

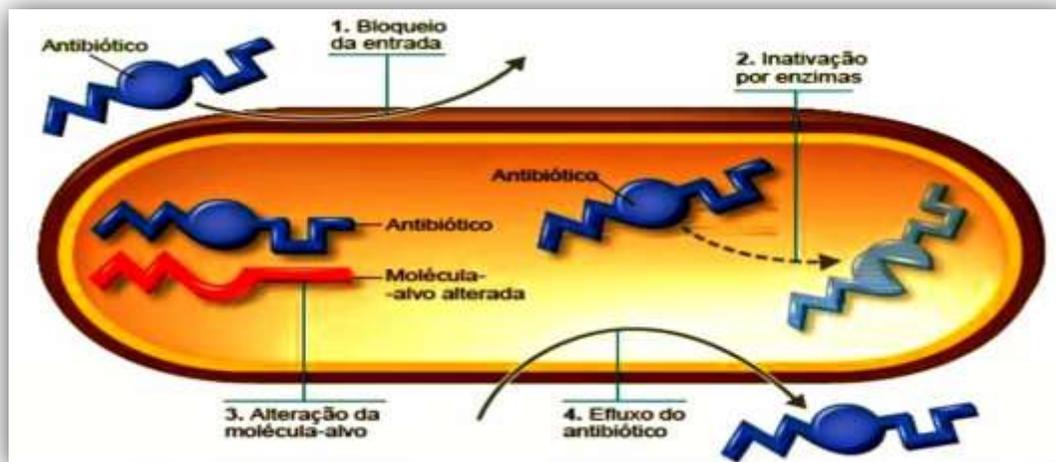
As bactérias apresentam genes que sintetizam algumas enzimas com capacidade de degradar ou modificar de forma efectiva os antibióticos, um dos exemplos, são as penicilinasas, cefalosporinasas, carbapenemases. As penicilinasas são produzidas por uma variedade de bactérias incluindo o *S. aureus* e certas bactérias gram negativas. As cefalosporinasas, cefamicinasas e carbapenemases são enzimas que degradam antibióticos de amplo espectro de acção, essas enzimas são sintetizadas por bactérias gram-negativas como *E. coli*, *Klebsiella spp*, *Pseudomonas aeruginosa* entre outras (Dalmolin *et al.*, 2022).

### 2.8.2. Enzimas que alteram o antibiótico

Algumas enzimas sintetizadas pelas bactérias quando entram em contacto com o antibiótico, eles transferem substâncias para as moléculas dos agentes antimicrobianos, causando a modificação na conformação do antibiótico e inactivando-o. Actuam em aminoglicosídeos, macrolídeos e fenóis. As enzimas que modificam aminoglicosídeos, são principais formas de resistência desse grupo, pois alteram a estrutura química, impedindo a ligação do antibiótico com as subunidades ribossómicas bacterianas (Dzidic e Suskovic, 2008).

### 2.8.3. Sistema de efluxo do antibiótico

É um mecanismo de defesa natural das bactérias, codificam genes cromossómicos, com função de excretar substâncias tóxicas resultantes do metabolismo da bactéria. A resistência ocorre quando há aumento na actividade desses sítios e consequentemente as substâncias tóxicas são mais excretadas, as classes de antibióticos que sofrem acção dessas substâncias são geralmente as fluoroquinolonas e tetraciclina (Dalmolin *et al.*, 2022).



**Figura 5** - Mecanismos de resistência aos antibióticos da célula procariótica.

#### 2.8.4. Formação de biofilmes

A formação de biofilme é considerada como uma forma nova de resistência desenvolvida pelos microorganismos, essa formação pode ocorrer em placas dentárias, cateteres e feridas traumáticas (Dalmolin *et al.*, 2022). Biofilme é um agregado de microorganismos como fungos e bactérias que crescem aderidos á uma superfície e revestida de moléculas como polissacarídeos, proteínas e ácidos nucleicos, os quais fazem parte da matriz que envolve o biofilme. A matriz os protege, dificultando a penetração e difusão dos antibióticos (Henriques *et al.*, 2013).



**Figura 6** - Formação de biofilme.

#### 2.9. Descrição dos microorganismos testados

O aumento das infecções causadas especificamente por bactérias e fungos em seres humanos vem aumentando exponencialmente e *Stphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Candida albicans* são alguns dos microorganismos com uma elevada taxa de virulência e resistência aos agentes antimicrobianos em seres humanos, sendo mais reportados em ambientes hospitalares (Kaper *et al.*, 2004).

#### 2.10. *Staphylococcus aureus*

São bactérias Gram-positivas, imóveis, sem esporos, são catálase positiva, formam agrupamentos irregulares semelhantes a cachos de uva. Essas bactérias são amplamente distribuídas na natureza e fazem parte da flora normal do Homem, podendo ser encontrado na pele, garganta, intestino e fossas nasais. A sua respiração é facultativa e são pouco exigentes nutricionalmente, podendo ser

cultivadas em Agar Manitol Salgado, Agar sangue e são fermentadores de lactose apresentando uma coloração que varia de branco para amarelo (João, 2018).

### **2.10.1. Doenças causadas por *Staphylococcus aureus***

Estatisticamente, cerca de 30% da população vive colonizada de forma assintomática com *S. aureus*. No entanto, essas bactérias podem ser altamente patogénicas para o Homem, podendo causar infecções que vão desde infecções mediadas por toxinas como: síndrome de choque escaldada, intoxicação alimentar, choque tóxico e infecções supurativas como: Impetigo, Foliculite, Furúnculos, Carbúnculo, bacteremia, endocardite, pneumonia, osteomielite, artrite séptica. Essas infecções são normalmente tratadas com uso de antibióticos, mas com o aumento do desenvolvimento e disseminação de cepas resistentes aos antibióticos o tratamento está cada vez mais difícil (Nikolic e Mudgil, 2023).

### **2.10.2. Mecanismo de resistência aos agentes antimicrobianos**

A resistência adquirida por *S. aureus* frente a Penicilina pode ser por meio da aquisição de genes como, *bIZ* que codifica as enzimas penicilinases conhecidos actualmente como beta-lactamases (Mahaluca, 2018), essas enzimas agem inibindo a acção da penicilina ao hidrolisar a estrutura do anel  $\beta$ -lactamico (Nikolic e Mudgil, 2023).

Os enterecocos resistentes a vancomicina (VRE) contêm plasmídeos com múltiplos factores de resistência a antibióticos e de virulência. Durante a co-infecção, *S. aureus* (MRSA) adquiriu plasmídeos de resistência de bactérias gram-positivas do género enterecoco por transformação (após a lise celular de enterecoco ocorreu a liberação do seu DNA) ou por conjugação das duas células bacterianas (Murray *et al.*, 2009). Essa espécie é geralmente sensível a Ciprofloxacina, amoxil + ácido clavulânico, Vancomicina e resistente a penicilina, oxacilina, meticilina, eritromicina e clindamicina (Bonesso *et al.*, 2011).

## **2.11. *Pseudomonas aeruginosa***

*Pseudomonas aeruginosa* é uma bactéria pertencente a família *Pseudomonadaceae* Gram-negativa aeróbica não-fermentadora de lactose, essas bactérias apresentam – se sob forma de bastonetes isolados ou em pares, a sua locomoção é realizada por flagelos polares (Abegg, 2007). Essa espécie de bactéria é comumente encontrado no solo, água, e nos vegetais, para além disso, essas bactérias fazem parte da flora normal do Homem, podem ser encontradas na pele, garganta, e nas fezes de indivíduos saudáveis. Essa bactéria é considerada oportunista (Murray *et al.*, 2006).

*P. aeruginosa* produz pigmentos que emitem uma coloração específica de acordo com a composição química do meio de cultura, Píocianina (azul), pioverdina (verde-amarelo), piorrubrina (vermelho) e piomelanina (marrom escuro). A produção da pioverdina pode ser estimulada em meios de cultura contendo glicerol, magnésio, potássio e ferro. Esse pigmento altera a coloração do meio de cultura, tornando toda superfície do meio de cultura verde (De Freitas, 2003).

### **2.11.1. Doenças causadas por *Pseudomonas aeruginosa***

As infecções causadas por essa espécie de bactéria são mais relatadas com maior frequência em ambientes hospitalares, é responsável por causar infecções desde as mais leves como, infecção ao canal auditivo externo, febre e úlceras até as infecções mais invasivas ou graves como, pneumonia, infecção urinária e artrite infecciosa (João, 2015).

*P. aeruginosa* é responsável por uma em cada dez infecções nasocomiais, especialmente em unidade de queimados causando úlceras. Em ambientes hospitalares e outros ambientes onde os agentes farmacêuticos são preparados, a capacidade de *P. aeruginosa* crescer a partir de quantidades mínimas de fontes incomuns de carbono, como resíduos de sabão ou adesivos de revestimento de tampas encontradas em uma solução, tem sido um grande problema inesperado e preocupante. Essa espécie é capaz de crescer em alguns compostos químicos anti-sépticos altamente tóxicos para cepas bacterianas, como compostos de amónio quaternário (cloreto de dodecil dimetil amónio e cloreto de benzacônio) (Tortora *et al.*, 2012).

### **2.12.2. Mecanismo de resistência aos agentes antimicrobianos**

Essa espécie de bactéria desencadeia uma série de factores que potencializam a sua virulência e resistência aos antibióticos, produzindo polissacarídeos extracelulares que podem inibir a fagocitose no hospedeiro, prejudicando assim, a difusão de antimicrobianos e facilitando a colonização bacteriana piorando no entanto, o quadro clínico do paciente. Para além da síntese de polissacarídeos extracelulares, essas bactérias sintetizam toxinas, uma delas é a toxina A, considerada como a proteína extracelular mais prejudicial, ela é sintetizada por aproximadamente 90% de cepas de *P. aeruginosa*, age no hospedeiro bloqueando a síntese proteico e age na destruição do tecido do hospedeiro. Algumas espécies produzem enzimas betalactamases, o qual age na degradação dos antibióticos, incluindo antibióticos carbapenêmicos, os quais são antibióticos que apresentam amplo espectro de acção (Abegg, 2007).

Os antibióticos da classe Cefalosporinas como, ceftarolina e ceftobiprol constituem a primeira escolha para o tratamento de infecções causadas por *P. aeruginosa*. No entanto, devido a resistência aos antibióticos desta classe, os antibióticos carbapenêmicos, como imipenem, meropenem e doripenem, são frequentemente utilizados como tratamento de escolha para infecções graves causadas por *P. aeruginosa*, principalmente em ambientes hospitalares. Esses antibióticos apresentam um amplo espectro de acção e são eficazes contra bactérias gram negativas, incluindo *P. aeruginosa*. Embora os carbapenêmicos sejam eficazes, o número de insulados de *P. aeruginosa* resistentes a esses antibióticos vem aumentando gradualmente (Figueredo *et al.*, 2021).

### **2.12. *Candida albicans***

São leveduras de forma oval aeróbia, tem entre 2 a 6 µm de diâmetro, apresenta brotos, hifas e pseudo-hifas, constitui a flora normal do trato gastrointestinal, cavidade oral e do sistema reprodutor feminino. No entanto, sob certas circunstâncias essa espécie de fungo pode ser patogénico oportunista para o Homem, causando lhe várias infecções em hospedeiros com situações em que, o sistema imunológico ou o microbiota normal estejam comprometidos (Araújo *et al.*, 2023).

### **2.12.1. Doenças causadas por *Candida albicans***

As doenças causadas por essa espécie de fungo, são mais decorrentes principalmente em pacientes transplantados, indivíduos com HIV, com câncer e sob quimioterapia. Nesses indivíduos os fungos actuam como patógenos oportunistas por conta da debilidade do seu sistema imunológico do paciente. As infecções causadas por *C. albicans* incluem: infecção orofaríngea, esofagite, infecção vulvovaginal, infecção na pele, nas unhas, pneumonia, endocardite, pericardite, infecção no sistema nervoso central, infecção ocular, infecção óssea e nas articulações, infecção abdominal e hematogénicas (Murray *et al.*, 2010).

### **2.12.2. Mecanismo de resistência aos agentes antimicrobianos**

A resistência pode ocorrer em resposta ao uso inadequado de agentes antifúngicos (Nins, 2023). *C. albicans* possui mecanismos de resistência que contribuem para a sua capacidade de causar infecções. Isso inclui a capacidade de formar biofilmes, alteração de sítios de ligação de antifúngicos, produzir enzimas que degradam tecidos e alterar a sua forma de levedura para forma filamentosa, o qual é mais virulento e invasivo para o Homem (Valente *et al.*, 2021).

Geralmente, os antifúngicos da classe azóis, como o fluconazol, são escolhas para tratar infecções causadas por *C. albicans*. No entanto, a resistência a esses antifúngicos está aumentando gradualmente, principalmente em casos de infecções invasivas. Portanto, a escolha do antifúngico deve ser baseado nos resultados dos testes de sensibilidade antimicrobiana, e os antifúngicos geralmente usados são equinocandinas, anfotericina B e Nistatina (Araújo *et al.*, 2023).

Existem vários factores que contribuem para a recorrência de infecções nosocomiais a citar, falhas no procedimento de biossegurança como a utilização de equipamentos de protecção individual (EPI), técnicas de assepsia, ineficiência da vigilância de pacientes sob suspeita ou risco de infecções causadas por bactérias resistentes, isolamento não apropriado de pacientes infectados, deficiência dos serviços farmacêuticos, falha da dosagem, prescrição medica não adequado, uso indiscriminado de antimicrobianos, duração do tratamento prolongado e armazenamento não adequado dos antimicrobianos (Oliveira e Silva, 2008).

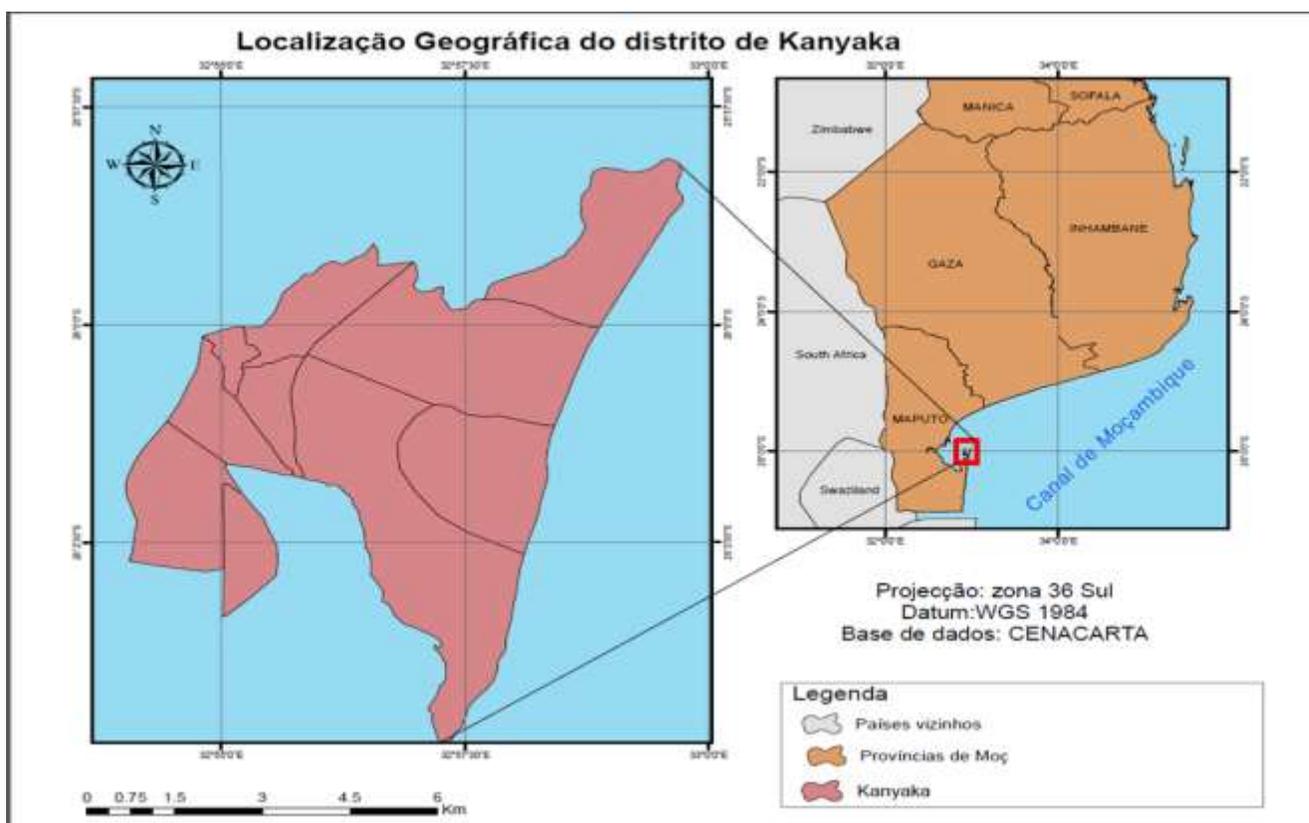
### **2.13. Polaridade dos solventes**

A polaridade do solvente está relacionada com o compartilhamento dos electrões entre os átomos, o qual leva a uma separação parcial de carga positiva e negativa. Uma molécula é considerada polar quando o compartilhamento de electrões ocorre de forma desigual e, apolar, quando o compartilhamento de electrões nos átomos ocorre de forma igual. Os solventes apolares como n-hexano não conseguem interagir de forma significativa com substâncias polares. As interacções entre as moléculas polares, como pontes de hidrogénio, são muito fortes de serem quebradas por solventes apolares. Por outro lado, Solventes polares como água, metanol ou etanol apresentam dipolos que interagem com essas fortes ligações, rompendo-as e dissolvendo substâncias polares de interesse (Russel, 1994).

### 3. ÁREA DE ESTUDO

A amostragem de macroalgas foi realizada no arquipélago da KaNyaka, na zona Ponta Mazónduè (perto do Farol). Situado a 32 km da cidade de Maputo, capital de Moçambique. O pequeno arquipélago é distrito municipal KaNyaka (Figura 7). O arquipélago é constituído pelas Ilhas da KaNyaka (42,5 km<sup>2</sup>) e Ilha dos Portugueses (3,7 km<sup>2</sup>). A Ilha da KaNyaka possui um comprimento de aproximadamente 12,5 km da Ponta Mazónduè (Norte a Este) à Ponta Torres (Sul a Este) e uma largura máxima de cerca de 7 km da Barreira Vermelha (Oeste) a Malengane (Este) (Cassicaí, 2012).

Toda zona costeira com vegetação natural do arquipelago de KaNyaka é protegida como reserva integral, sob a responsabilidade da estação de Biologia Marítima da Universidade Eduardo Mondlane. Os ensaios microbiológicos e análises fitoquímicas foram realizados na Faculdade de Medicina e no departamento de química da Universidade Eduardo Mondlane respectivamente.



**Figura 7** - Mapa mostrando a localização da ilha de Inhaca a cor vermelho Fonte: WGS.

## **4. MATERIAIS E MÉTODOS**

### **4.1. Material não Biológico**

Sacos plásticos, faca, caixa de transporte de amostras, Papel de alumínio, papel de filtro tipo *Whatman* nº 1, Espátulas, Provetas graduadas de 100 ml, Frascos de 50 ml, tubos do tipo *Falcon* de 15 ml, *Erlenmeyers*, Parafilme, suporte de tubos, placas de petri de 150 mm, Vidro de relógio, pinça metálica, Discos de difusão feito com papel de filtro, Luvas, Mascaras, ansa bacteriológica, zaragatoas estéreis, micropipetas de 100 µl, autoclave, Rotavapor a vácuo, Furador de discos, Densitómetro, Vortex, balança analítica, Homogeneizador, Moinho eléctrico.

#### **a) Reagentes:**

Metanol a 99.9%, n-Hexano, soro fisiológico e água destilada.

#### **b) Meios de transporte no campo**

Barco e carro institucional.

#### **c) Meios de cultura:**

Ágar Manitol Sal, Ágar Cetrimida, Ágar Dextrose Sabouraud e Ágar Muller Hinton.

#### **d) Discos de antibióticos e discos preparados com extractos de Macroalgas:**

Disco de Vancomicina (30µg), Discos de Imepinem (10µg), Nistatina (100µg), Disco impregnados de extractos de macroalgas.

### **4.2. Material Biológico:**

**Macroalgas:** *Caulerpa racemosa* e *Sargassum ilicifolium*.

**Bactérias:** Cepas padrão de *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 e *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.

**Fungo:** *Candida albicans* não padrão.

### **4.3. Amostragem**

A colecta de macroalgas foi realizada em Abril de 2024 na ilha de Inhaca, província de Maputo. Aproximadamente 500g de macroalgas *Caulerpa racemosa* e *Sargassum ilicifolium* foram colhidas manualmente e com recurso a faca para a retirada de algas fixas ao substrato. No local, as espécies colhidas foram identificadas e confirmadas com auxílio de manuais, fotos baixadas na internet e com ajuda dos orientadores Luísa, Amós e Maria. Posteriormente foram colocados em sacos plásticos com água do mar, para evitar a dessecação e transportadas em uma caixa de transporte de amostras com pedra de gelo, onde a temperatura era em média 4°C até ao laboratório da Faculdade de Ciências Biológicas na Universidade Eduardo Mondlane. No laboratório B9, as algas foram enxaguadas com água corrente removendo todas partículas de areia e materiais estranhas e necróticas e por último, as algas foram colocadas separadamente nas bandejas com papel de alumínio e papel absorvente e foram levadas até a estufa natural do DCB onde, procedeu-se com o processo de secagem que durou 4 dias. A temperatura da estufa era em média 40°C.

### **4.4. Extracção de compostos bioactivos de macroalgas**

Depois do processo de secagem, as algas foram colocadas em sacos plásticos e cobertos com papel de alumínio e levadas até ao Laboratório de Engenharia de Moçambique (LEM), onde procedeu-se com o processo de trituração, depois da trituração até a obtenção do pó, o pó de cada espécie de macroalga foi pesado e registado o seu peso.

#### **4.4.1. Obtenção dos extractos**

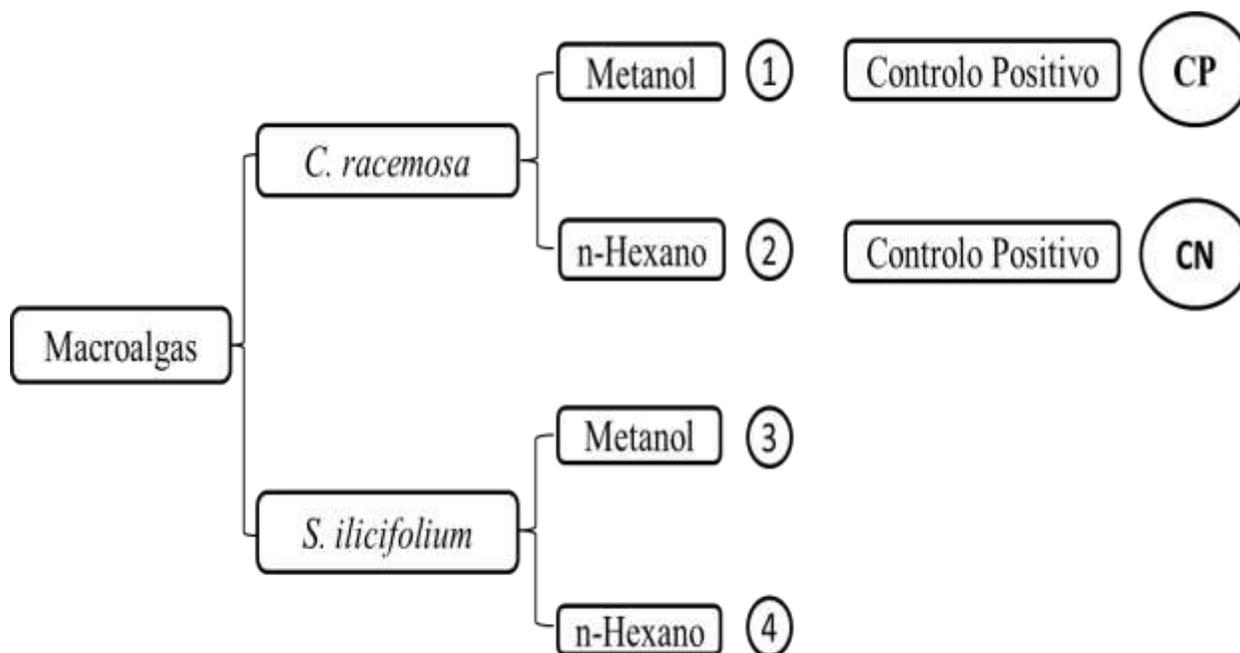
Para a obtenção de extractos concentrados, foi usado o método de maceração proposto por Trigui *et al.*, (2012), com certas modificações.

Os extractos de macroalgas *Caulerpa racemosa* e *Sargassum ilicifolium* foram obtidos utilizando dois solventes, metanol a 99.9% e n-hexano posteriormente macerados em dois tempos distintos, 24 e 48 horas (Figura 8).

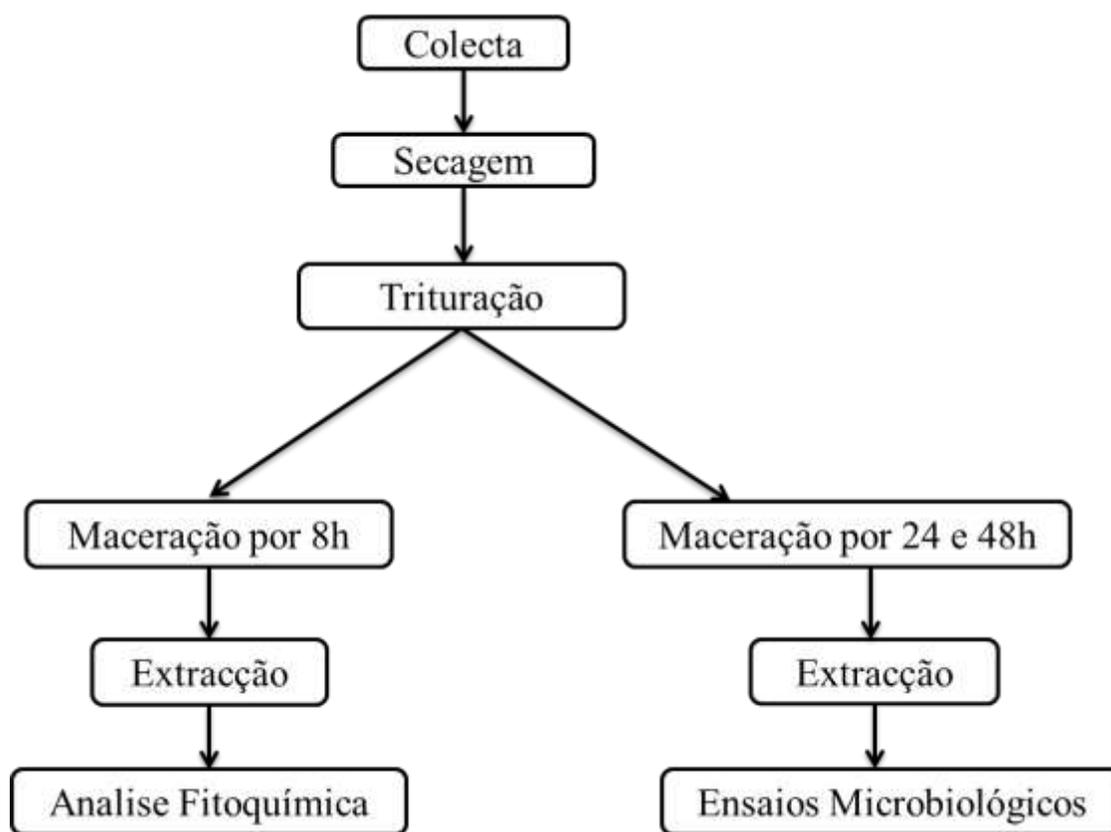
*Avaliação da Actividade Antimicrobiana de diferentes Extractos de Macroalgas Sargassum ilicifolium e Caulerpa racemosa Colectadas na Ilha de Inhaca, Província de Maputo*

Para tal, 10g do pó de *Caulerpa racemosa* foi homogeneizado em 100 ml de solventes metanol e n-hexano em balões *erlenmeyers* respectivamente, e colocadas a macerar no agitador a 180 rpm durante 24 h. Passado o tempo de maceração, as duas soluções foram filtradas em balões *erlenmeyers* usando papel de filtro *Whatman n° 1*, as soluções obtidas foram evaporadas em Rota-Evaporador até obter 1.5 ml de extractos concentrados, os quais foram colocados em tubos de *Falcon* de 15 ml. Posteriormente, os extractos obtidos foram envolvidos em papel de alumínio e acondicionados em uma caixa de transporte de amostras com pedra de gelo, onde a temperatura média era de 4 °C. Em seguida, foram levados até ao laboratório de Microbiologia da Faculdade de Medicina da Universidade Eduardo Mondlane, onde procedeu-se com os ensaios microbiológicos. Todos os extractos foram preparados em triplicata. Repetiu-se o procedimento para a maceração por 48 h.

Igual procedimento foi realizado para a extracção de compostos bioactivos de *Sargassum ilicifolium*.



**Figura 8** - Esquema ilustrativa de fluxograma de extração de compostos bioactivos macerados por 24/48 horas.



**Figura 9** – Esquema ilustrativo de etapas seguidas desde a amostragem até a realização de análises fitoquímicas e ensaios microbiológicos.

#### **4.5. Ensaio da actividade antimicrobiana dos extractos metanólicos e hexanólicos de macroalgas macerados por 24 e 48 horas**

##### **4.5.1. Preparação dos discos de papel de filtro e impregnação de extractos líquidos de macroalgas**

Os discos foram preparados usando papel de filtro, tipo *Whatman* nº 1. Com o recurso a um furador de papel, foram preparados os discos com diâmetro de 5 mm. Posteriormente, os discos foram etiquetados usando lápis de grafite com as seguintes denominações (1,2,3 e 4). Os discos já preparados foram posteriormente colocados em uma placa de pirex e embrulhados com papel e foram esterilizados a temperatura de 160° C durante 4 horas.

#### **4.6. Avaliação da actividade antimicrobiana**

Para avaliar a actividade antimicrobiana dos extractos líquidos de macroalgas, foi seguido o método proposto por Kiber Bauer *et al.* (1966) com algumas modificações, conhecido como teste de susceptibilidade em disco de difusão (Hudzicki, 2009).

##### **4.6.1. Subcultivo e Suspensão microbiana**

Os ensaios da actividade antimicrobiana foram realizados a partir de culturas puras de *Staphylococcus aureus* (crescidos em Agar Sal Manitol), *Pseudomonas aeruginosa* (crescidos em ágar cetrimida) e *Candida albicans* (crescidos em ágar Dextrose Sabouraud), cultivados no dia anterior. Foram seleccionadas duas a três colónias isoladas, com auxílio de uma ansa bacteriológica previamente esterilizada e adicionadas no tubo de ensaio contendo 5 ml de solução salina (soro fisiológico a 0.9%). A solução foi homogeneizada com auxílio de um agitador (vortex) e com ajuda do densitómetro foi medido a turvação da suspensão. A turvação da suspensão resultante foi depois comparada a turvação padrão na escala de 0.5 de MacFarland, equivalentes a 0,08 a 0,1 de absorvância no comprimento de onda de 580 nm e a mesma é equivalente a  $1,2 \times 10^8$  unidades formadoras de colónias (UFC).

#### **4.6.2. Inoculação dos microorganismos**

Com auxílio de uma zaragatoa estéril, foi mergulhado no tubo com suspensão bacteriana, girou-se a zaragatoa a lateral do tubo (acima do fluido) usando pressão firme, de modo a diminuir o excesso de fluido. Posteriormente, foi inoculado na superfície de cada placa de ágar Mueller-Hinton (*Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*) e ágar Dextrose Sabouraud (*Candida albicans*) espalhado uniformemente, tendo realizado 60 graus de cada vez, de modo a garantir uma distribuição uniforme.

#### **4.6.3. Impregnação dos extractos nos discos**

Foram empregues com a micropipeta para os discos enumerados com 1 e 2 previamente preparadas, um volume de 10 µl de extracto líquido de macroalgas *Caulerpa racemosa* previamente tratado com metanol e n-hexano respectivamente.

Para os discos que foram enumerados com 3 e 4, também foram empregues um volume de 10 µl de extracto líquido de macroalgas *Sargassum ilicifolium* tratado com metanol e n-hexano respectivamente.

Os discos de Vacomicina (30 µg), Imipinem (10 µg) e Nistitina (100 µg) foram usados como controle positivo (CP) para o *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Candida albicans* respectivamente. Os discos embebidos com água destilada foram usados como controle negativo (CN). Todos procedimentos foram realizados perto da chama para garantir um ambiente asséptico e os ensaios foram preparados em triplicata.

Posteriormente, os discos impregnados com os respectivos extractos líquidos de macroalga e os respectivos controlos foram colocados na superfície do meio onde o microorganismo teste estava inoculado. As placas foram incubadas a 37 °C por 24 h para *S. aureus* e *P. aeruginosa* e 24 h a 72 h para a *C. albicans*, com as tampas viradas para cima.

#### **4.6.4. Leitura dos resultados do antibiograma**

Os halos de inibição foram avaliados após 24 horas de incubação, sob a forma de uma área circular, transparente, sem crescimento antimicrobiano, geometricamente circunscrita ao disco de papel. Foram depois medidos os diâmetros desses halos com o auxílio de um parquímetro digital.

Foram comparadas as médias dos diâmetros (mm) dos halos de inibição formados a partir dos discos embebidos com extractos metanólicos e hexanólicos de macroalgas *Sargassum ilicifolium* e *C. racemosa* macerados por 24 e 48 h frente a *S. aureus*, *P. aeruginosa* e *C. albicans*.

Igual procedimento foi realizado para extractos metanólicos e hexanólicos macerados por 48 horas.

#### **4.7. Cromatografia gasosa de espectro de massa (GC-MS)**

As análises fitoquímicas das macroalgas foram realizadas seguindo a metodologia proposto por Dias *et al.* (2020) Foi pesado 5g em pó de cada amostra de macroalga (*Caulerpa racemosa* e *Sargassum ilicifolium*), transferida para 2 frascos e adicionado 10 ml de metanol para cada frasco até que o pó estivesse totalmente imerso, a solução foi macerada durante 8 h sob agitação a 180 rpm e seguida filtrada com auxílio de papel de filtro *Whatmann* nº 1. Os filtrados foram concentrados até obter 1ml e fazendo borbulhar o azoto gasoso na solução obtida.

O extracto contém componentes polares e apolares do material e 2 µm de amostra da solução foi impregnado em GC-MS para análise de diferentes compostos. A análise GC-MS foi realizada usando um cromatógrafo de gás do sistema Agilent 7820<sup>a</sup> GC equipado e acoplado a um detentor de massa turbo massa gold, coluna -5 MS 30m (comprimento) 250 µm (filme). O instrumento pra o uso foi ajustado para uma temperatura inicial de 110 °C e mantido nessa temperatura por 2 min. Findo esse período, a temperatura do forno foi elevado até 280 °C, a uma taxa de aumento de 5 °C por minuto e foi mantido por volta de 9 minutos. A temperatura da porta de injeção foi garantida como 250 °C e taxa de fluxo de hélio com 1 ml por minuto. A voltagem de ionização foi de 70eV.

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 / s). A interpretação dos resultados foi realizada através da comparação dos espectros de massa dos compostos obtidos com os espectros contidos na base de dados do National Institute of Standards and Technology (NIST) 2014. Apresentando mais de 62.000 padrões, nome, peso molecular e a estrutura dos componentes.

#### **4.8. Análise de dados**

Foi feita a análise descritiva dos dados, os dados obtidos neste estudo foram organizadas na ferramenta Microsoft Excel 2013. Para a comparação da eficiência do solvente (metanol e n-hexano) e o tempo de maceração (24 e 48h) na extracção de compostos bioactivos de macroalgas *Caulerpa racemosa* e *Sargassum ilicifolium*, recorreu - se ao teste *t*.

Os resultados foram analisados usando o programa Microsoft Excel 2013, apresentados sob forma de média e o desvio padrão (DP). Todas as análises realizadas, foi considerado o nível de significância de 5% (0,05) e a diferença foi considerada significativa nos valores de  $P < 0.05$ .

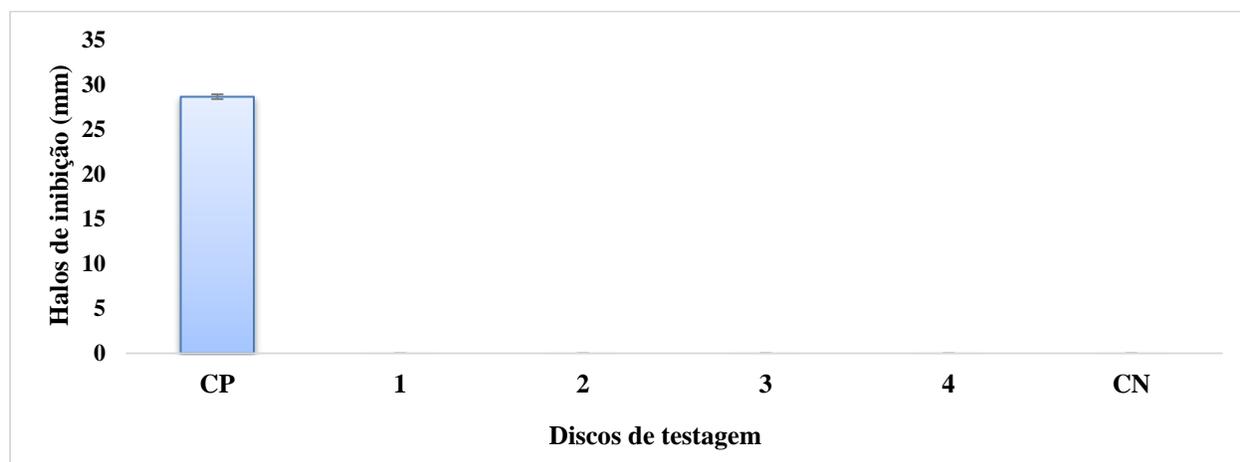
## 5. RESULTADOS

### 5.1. Teste de Sensibilidade de *Staphylococcus aureus* aos extractos metanólicos e hexanólicos de macroalgas *Caulerpa racemosa* e *Sargassum ilicifolium* macerados por 24 e 48 horas

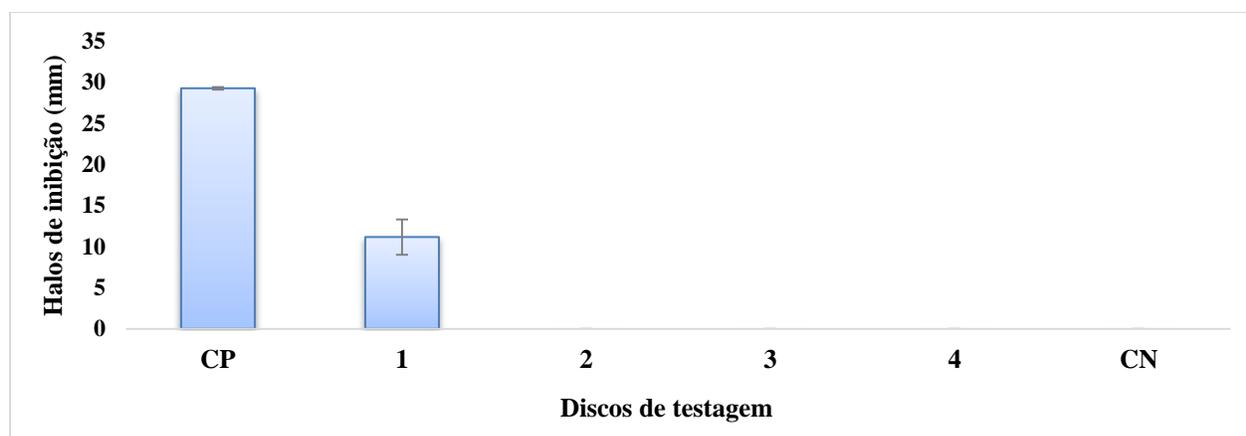
Realizaram-se ensaios de sensibilidade antimicrobiana de extractos metanólicos e hexanólicos de macroalgas *Caulerpa racemosa* e *Sargassum ilicifolium* macerados por 24 e 48 horas frente a *S. aureus*. Foi usado como controlo positivo (CP) Vancomicina (30 µg) e como controlo negativo (CN) água destilada.

Os resultados mostraram que os extractos metanólicos macerados por 48 horas inibiram o crescimento de *S. aureus*, especificamente o extracto metanólico de *C. racemosa*. Observou-se halo médio de inibição de 11.16 ( $\pm$  2.14) mm e o disco de vancomicina (30 µg) apresentou halo médio de inibição de 29.26 ( $\pm$  0.15) mm (Figura 11 e Figura 12). Contudo, nenhum halo de inibição foi observado nos extractos macerados por 24 horas (Figura 10).

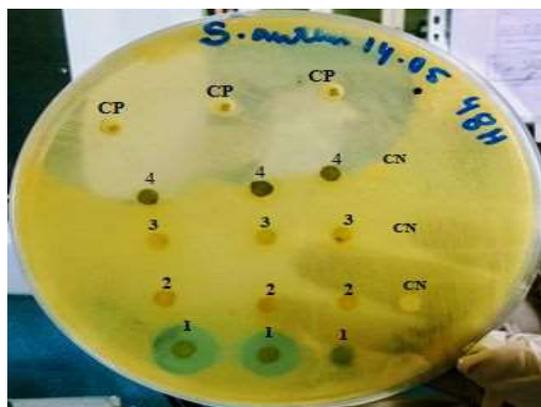
As análises estatísticas indicaram que os extractos hexanólicos de *C. racemosa* macerados por 24 e 48 horas mostraram uma diferença significativa na inibição de *S. aureus*, como evidenciado pelos diâmetros dos halos de inibição no qual o  $P < 0.05$  (Anexo 11). Os resultados estatísticos revelaram também que houve diferenças significativas nos diâmetros dos halos de inibição entre os extractos metanólicos e hexanólicos de *C. racemosa* macerados por 48 horas frente a *S. aureus* no qual o  $P < 0.05$  (Anexo 12).



**Figura 10** - Média ( $\pm$  DP) do halo de inibição de Actividade antimicrobiano dos extractos metanólicos e hexanólicos macerados por 24 h de duas espécies de macroalga frente a *S. aureus*. **1** - *C. racemosa* metanólico; **2** - *C. racemosa* hexanólico; **3** - *S. ilicifolium* metanólico; **4** - *S. ilicifolium* hexanólico. Vancomicina 30  $\mu$ g (controle positivo) e água destilada (Controlo negativo).



**Figura 11** - Média ( $\pm$  DP) do halo de inibição de actividade antimicrobiano dos extractos metanólicos e hexanólicos macerados por 48 h de duas espécies de macroalgas frente a bactéria *S. aureus*. **1** - *C. racemosa* metanólico; **2** - *C. racemosa* hexanólico; **3** - *S. ilicifolium* metanólicos; **4** - *S. ilicifolium* hexanólico. Vancomicina 30  $\mu$ g (controle positivo) e água destilada (Controlo negativo).



**Figura 12** – Representação dos resultados obtidos nos ensaios microbiológicos de extractos de macroalgas macerados por 48 horas frente a *S. aureus*.

## **5.2. Teste de sensibilidade de *Pseudomonas aeruginosa* aos extractos metanólicos e hexanólicos de macroalgas *Caulerpa racemosa* e *Sargassum ilicifolium* macerados por 24 e 48 horas**

Realizaram-se ensaios de sensibilidade antimicrobiana de extractos metanólicos e hexanólicos de macroalgas *Caulerpa racemosa* e *Sargassum ilicifolium* macerados por 24 e 48 horas frente a *P. aeruginosa*. Foi usado como controlo positivo (CP) Imipenem (10 µg) e como controlo negativo (CN) água destilada.

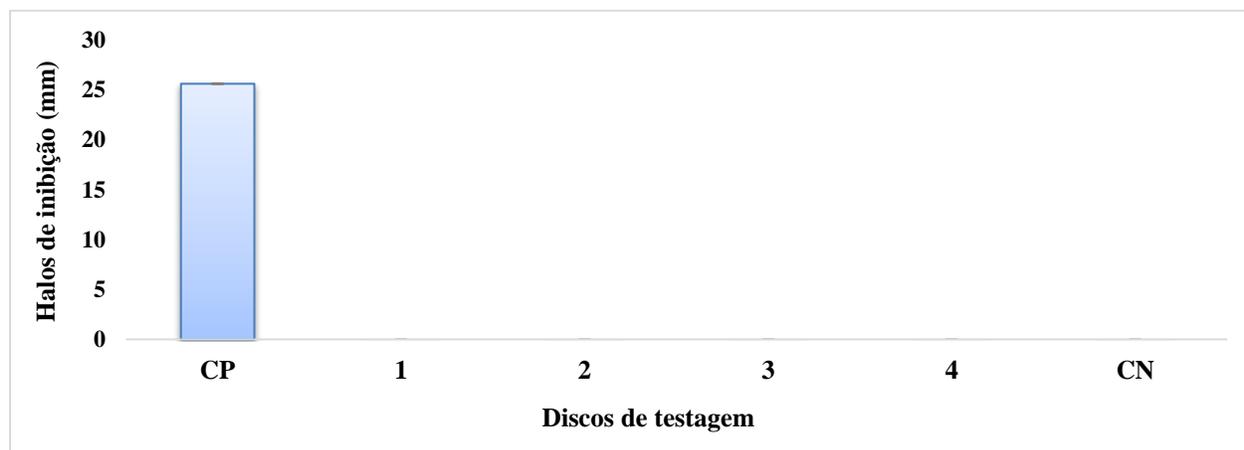
Os resultados mostraram que os extractos metanólicos e hexanólicos de *C. racemosa* e *S. ilicifolium* macerados por 48 horas, inibiram o crescimento de *P. aeruginosa*. Observou-se halo médio de inibição de 29.79 ( $\pm$  2.94) mm de extracto de *C. racemosa* metanólico, 14.28 ( $\pm$  1.16) mm de extracto de *C. racemosa* hexanólico, 28.12 ( $\pm$  0.56) mm de extracto metanólico de *S. ilicifolium*, 17.58 ( $\pm$  1.80) mm de extracto de *S. ilicifolium* hexanólico. Os discos com Imepinem (10 µg) apresentaram halo médio de 26.67 mm (Figura 14 e Figura 15). Contudo, nenhum halo de inibição foi observado nos extractos macerados por 24 horas (Figura 13).

*Avaliação da Actividade Antimicrobiana de diferentes Extractos de Macroalgas Sargassum ilicifolium e Caulerpa racemosa Colectadas na Ilha de Inhaca, Província de Maputo*

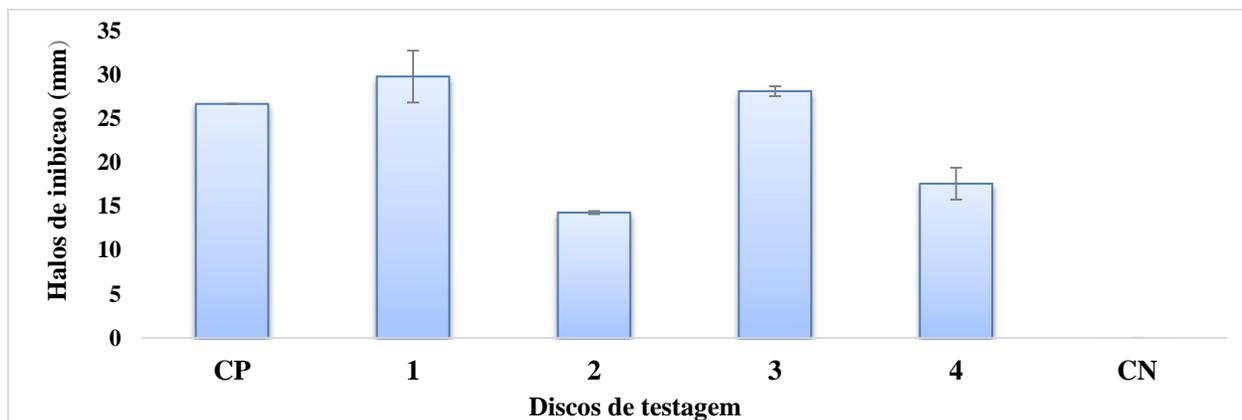
---

As análises estatísticas indicam que os extractos hexanólicos de macroalga *C. racemosa* macerados por 24 e 48 horas mostraram uma diferença significativa na inibição de *P. aeruginosa*, como evidenciado pelos diâmetros dos halos de inibição no qual o  $P < 0.05$  (Anexo 13).

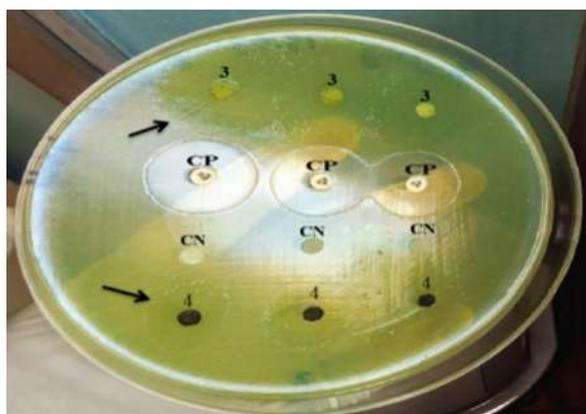
Em relação ao tipo de solvente, os resultados estatísticos mostraram que houve diferenças significativas entre os extractos metanólicos e hexanólicos de macroalga *C. racemosa* macerados por 48 h frente a *P. aeruginosa* no qual o  $P < 0.05$  (Anexo 14). Os resultados estatísticos mostraram também que houve diferenças significativas entre os extractos metanólicos e hexanólicos de macroalga *S. ilicifolium* macerados por 48 h frente a *P. aeruginosa* o qual o  $P < 0.05$  (Anexo 15).



**Figura 13** - Média ( $\pm$  DP) do halo de inibição de actividade antimicrobiano dos extractos metanólicos e hexanólicos macerados por 24 h de duas espécies de macroalga frente a bactéria *P. aeruginosa*. **1** - *C. racemosa* metanólico; **2** - *C. racemosa* hexanólico; **3** - *S. ilicifolium* metanólico; **4** - *S. ilicifolium* hexanólico. Imipinem 10  $\mu$ g (controle positivo) e água destilada (Controlo negativo).



**Figura 14** - Média ( $\pm$  DP) do halo de inibição de actividade antimicrobiano dos extractos metanólicos e hexanólicos macerados por 48 h de duas espécies de macroalga frente a bactéria *P. aeruginosa*. **1** - *C. racemosa* metanólico; **2** - *C. racemosa* hexanólico; **3** - *S. ilicifolium* metanólico; **4** - *S. ilicifolium* hexanólico. Imipinem 10  $\mu$ g (controle positivo) e água destilada (Controlo negativo).



**Figura 15** - Representação dos resultados obtidos nos ensaios microbiológicos de extractos de macroalgas macerados por 48 horas frente a *P. aeruginosa*.

### **5.3. Teste de sensibilidade de *Candida albicans* aos extractos metanólicos e hexanólicos de macroalga *Caulerpa racemosa* e *Sargassum ilicifolium* macerados por 24 e 48 horas**

Realizaram-se ensaios de sensibilidade antimicrobiana de extractos metanólicos e hexanólicos de macroalgas *Caulerpa racemosa* e *Sargassum ilicifolium* macerados por 24 e 48 horas frente a

*Candida albicans*. Foi usado como controlo positivo (CP) Nistitina (100µg) e, como controlo negativo (CN) água destilada.

### **5.3.1. Leitura dos resultados após 72 horas de incubação de *C. albicans***

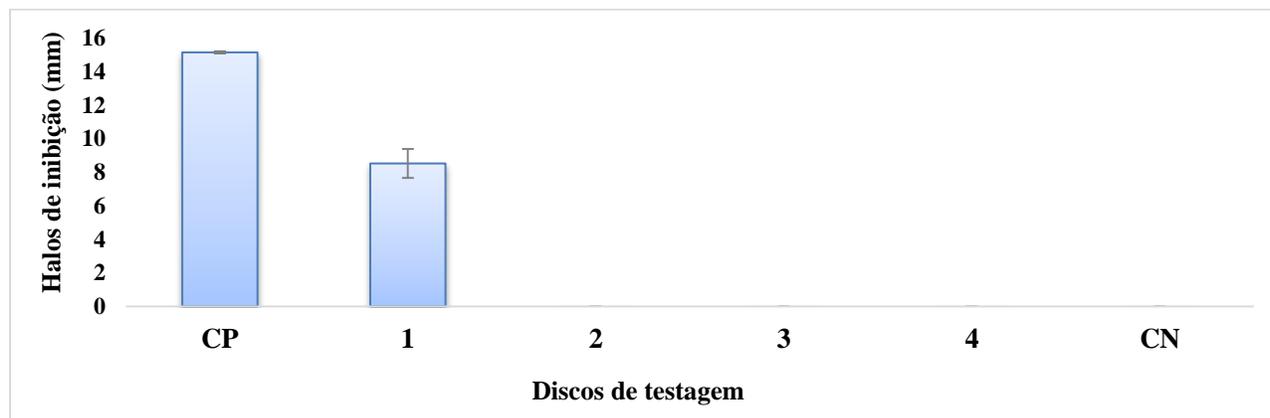
Após o período de incubação, os resultados mostram que ambos os extractos tratados com metanol e n-hexano e macerados por 24 e 48 horas inibiram o crescimento de *C. albicans*.

Os extractos metanólicos de *C. racemosa* macerados por 24 horas apresentaram halo médio de inibição de 8.53 mm ( $\pm 1.19$ ) mm. Os discos com Nistitina (100µg) apresentaram halo médio de inibição de 15.16 ( $\pm 0.05$ ) mm. Contudo, nenhum halo de inibição foi observado nos extractos hexanólicos de *C. racemosa*, extractos metanólicos de *S. ilicifolium* e nos extractos hexanólicos de *S. ilicifolium* (Figura 16 e Figura 17).

Em relação aos extractos hexanólicos macerados por 48 horas, especificamente os extractos hexanólicos de *S. ilicifolium* inibiram o crescimento de *Candida albicans*, mostrando um halo médio de inibição de 7.8 ( $\pm 1.34$ ) mm e os discos de Nistitina apresentaram halo médio de 15.4 ( $\pm 0.1$ ) mm. Contudo, nenhum halo de inibição foi observado nos extractos metanólicos de *C. racemosa*, extractos hexanólicos de *C. racemosa* e extractos metanólicos de *S. ilicifolium* (Figura 18 e Figura 19).

As análises estatísticas indicam que os extractos hexanólicos de macroalga *C. racemosa* macerados por 24 e 48 horas mostraram diferenças significativas na inibição de *C. albicans*, como evidenciado pelos diâmetros dos halos de inibição no qual o  $P < 0.05$  (Anexo 16). Os resultados estatísticos mostraram também que houve diferenças significativas entre os extractos metanólicos e hexanólicos de macroalga *S. ilicifolium* macerados por 48 h frente a *C. albicans* no qual o  $P < 0.05$  (Anexo 17).

Portanto, o facto de o valor de  $P$  ser menor que o valor de  $\alpha$  (0.05) sugere que o tempo de maceração assim como o tipo de solvente empregue influenciaram significativamente a eficácia dos extractos de macroalgas frente as cepas microbianas *S. aureus*, *P. aeruginosa* e a *C. albicans*.



**Figura 16** - Média ( $\pm$  DP) do halo de inibição de actividade antimicrobiano dos extractos metanólicos e hexanólicos macerados por 24 h de duas espécies de macroalga frente a bactéria *C. albicans*. **1** - *C. racemosa* metanólico; **2** - *C. racemosa* hexanólico; **3** - *S. ilicifolium* metanólico; **4** - *S. ilicifolium* hexanólico. Nistitina 100  $\mu$ g (controle positivo) e água destilada (Controlo negativo).

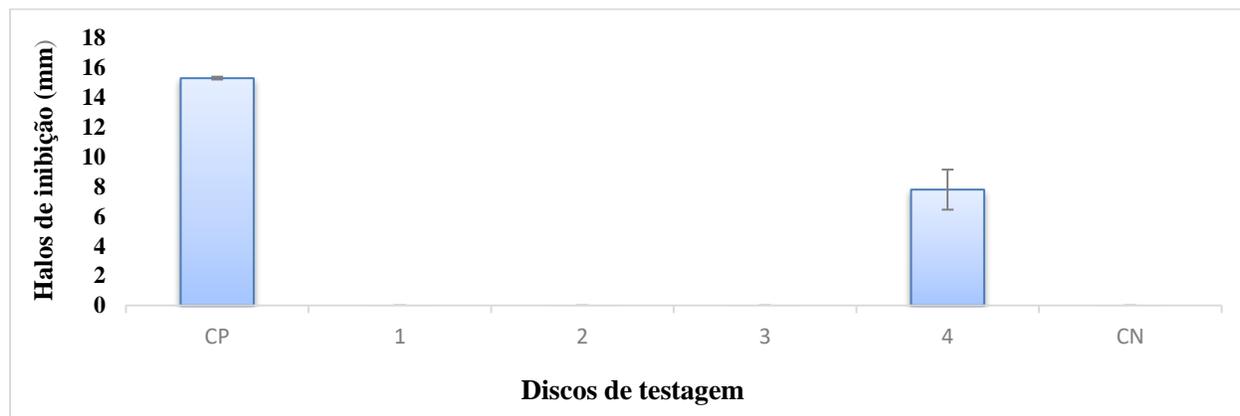


**Figura 17** - Representação dos resultados obtidos nos ensaios microbiológicos de extractos de macroalgas macerados por 24 horas frente a *C. albicans* incubado durante 72 horas.

### 5.3.2. Leitura dos resultados após 72 horas de incubação

Após 72 horas de incubação de *C. albicans*, observou-se que os diâmetros dos halos de inibição dos extractos metanólicos de *C. racemosa* e hexanólicos de *S. ilicifolium* macerados por 24 e 48 horas, não apresentaram nenhuma alteração em relação aos diâmetros dos halos de inibição. Em

contraste, com o controlo positivo, mostrou uma diminuição no diâmetro dos halos de inibição (Anexo 12).



**Figura 18** - Média ( $\pm$  DP) do halo de inibição de actividade antimicrobiano dos extractos metanólicos e hexanólicos macerados por 48 h de duas espécies de macroalga frente a bactéria *C. albicans*. **1** - *C. racemosa* metanólico; **2** - *C. racemosa* hexanólico; **3** - *S. ilicifolium* metanólico; **4** - *S. ilicifolium* hexanólico. Nistitina 100  $\mu$ g (controlo positivo) e água destilada (Controlo negativo).



**Figura 19** - Representação dos resultados obtidos nos ensaios microbiológicos de extractos de macroalgas macerados por 48 horas frente a *C. albicans* incubado durante 72 horas.

Todos os ensaios foram realizados em triplicata (3) e repetidos, de modo a dar mais confiabilidade e credibilidade nos resultados obtidos.

#### 5.4. Identificação dos fitocompostos pela técnica de cromatografia gasosa de espectro de massa (GC-MS) nos extractos metanólicos

Os extractos de macroalgas (*Caulerpa racemosa* e *Sargassum ilicifolium*) foram submetidos a testes qualitativos para a identificação dos compostos fitoquímicos através da técnica de Cromatografia Gasosa de Espectro de Massa (GC-MS). As análises fitoquímicas resultaram na identificação de vários compostos fitoquímicos, entre os quais Neophytadiene, Acetaldeído, 3,7,11,15 - Tetrametil-2-hexadecen-1-ol e ácido hexadecanóico. Foram identificados 18 compostos nos extractos metanólicos de *C. racemosa* e 05 nos extractos metanólicos de *S. ilicifolium*. Os compostos fitoquímicos Hexadecanoic acid, methyl ester e Neophytadiene, foram identificados em ambos extractos metanólicos de *C. racemosa* e *S. ilicifolium* (Tabela 1).

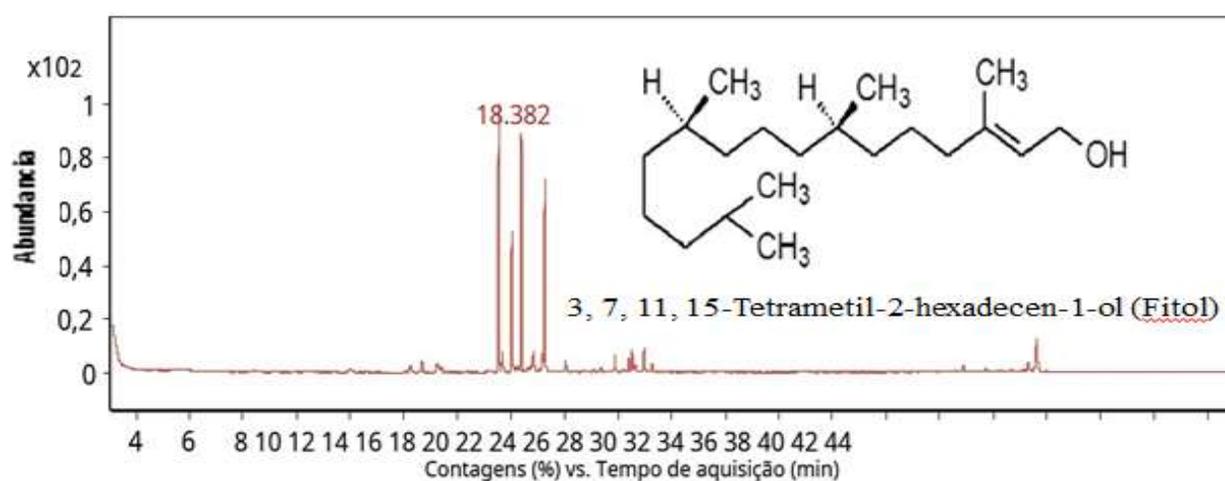
**Tabela 1** - Composição fitoquímica de extractos metanólicos de macroalgas de espécies *C. racemosa* e *S. ilicifolium* analisadas pelo método de GC-MS.

<i>Caulerpa racemosa</i>		<i>Sargassum ilicifolium</i>	
Fitocomposto	Formula	Fitocomposto	Formula
1. Silane, dimethoxymethyl	C <sub>3</sub> H <sub>10</sub> O <sub>2</sub> Si	Pentanal, 2,4-dimethyl	C <sub>7</sub> H <sub>14</sub> O
2. 2-Butanone, 3-methoxy-3-methyl	C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>2</sub>	1-Hexadecyne	C <sub>16</sub> H <sub>30</sub>
3. Cyclopentane, 1,1,3-trimethyl	C <sub>8</sub> H <sub>16</sub>	-	-
4. Pentane, 2,3,3-trimethyl	C <sub>8</sub> H <sub>18</sub>	9-Dodecenoic acid, methyl ester, (ester)	C <sub>13</sub> H <sub>24</sub> O <sub>2</sub>
5. 2,3,4-Trimethyl-1-pentanol	C <sub>8</sub> H <sub>18</sub> O	-	-
6. Acetaldehyde	C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> O	-	-
<b>7. Neophytadiene</b>	<b>C<sub>20</sub>H<sub>38</sub></b>	<b>Neophytadiene</b>	<b>C<sub>20</sub>H<sub>38</sub></b>
8. 2-Heptanone, 6-methyl	C <sub>8</sub> H <sub>16</sub> O	-	-
9. 3,7,11,15-Tetramethyl-2-hexadecen-1-ol	C <sub>20</sub> H <sub>40</sub> O	-	-
10. 5-Methyl-1-heptanol	C <sub>8</sub> H <sub>18</sub> O	-	-
11. 1,1'-Bicyclopropyl, 2,2,2',2'-tetramethyl	C <sub>10</sub> H <sub>18</sub>	-	-
12. Sulfurous acid, cyclohexylmethyl hexadecyl ester	C <sub>23</sub> H <sub>46</sub> O <sub>3</sub> S	-	-

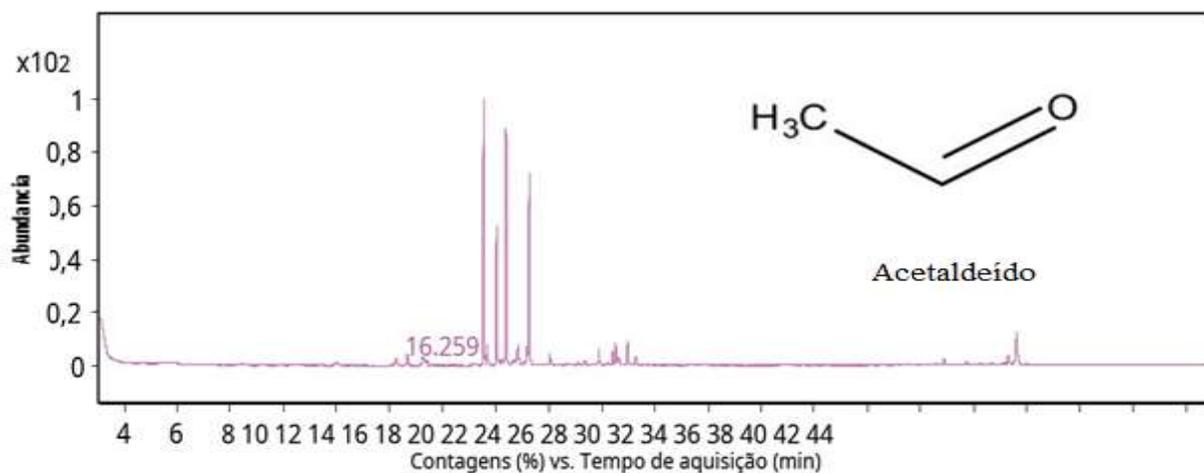
**Avaliação da Actividade Antimicrobiana de diferentes Extractos de Macroalgas *Sargassum ilicifolium* e *Caulerpa racemosa* Colectadas na Ilha de Inhaca, Província de Maputo**

13. Hexadecanoic acid, methyl ester	C <sub>17</sub> H <sub>34</sub> O <sub>2</sub>	Hexadecanoic acid, methyl ester	C <sub>17</sub> H <sub>34</sub> O <sub>2</sub>
14. Phthalic acid, cyclobutyl tridecyl ester	C <sub>25</sub> H <sub>38</sub> O <sub>4</sub>	-	-
15. 1,5-Heptadien-4-ol, 3,3,6-trimethyl	C <sub>10</sub> H <sub>18</sub> O	-	-
16. 2-Decyne	C <sub>10</sub> H <sub>18</sub>	-	-
17. 13-Tetradec-11-yn-1-ol	C <sub>14</sub> H <sub>24</sub> O	-	-
18. Tridecanoic acid, methyl ester	C <sub>14</sub> H <sub>28</sub> O <sub>2</sub>	-	-

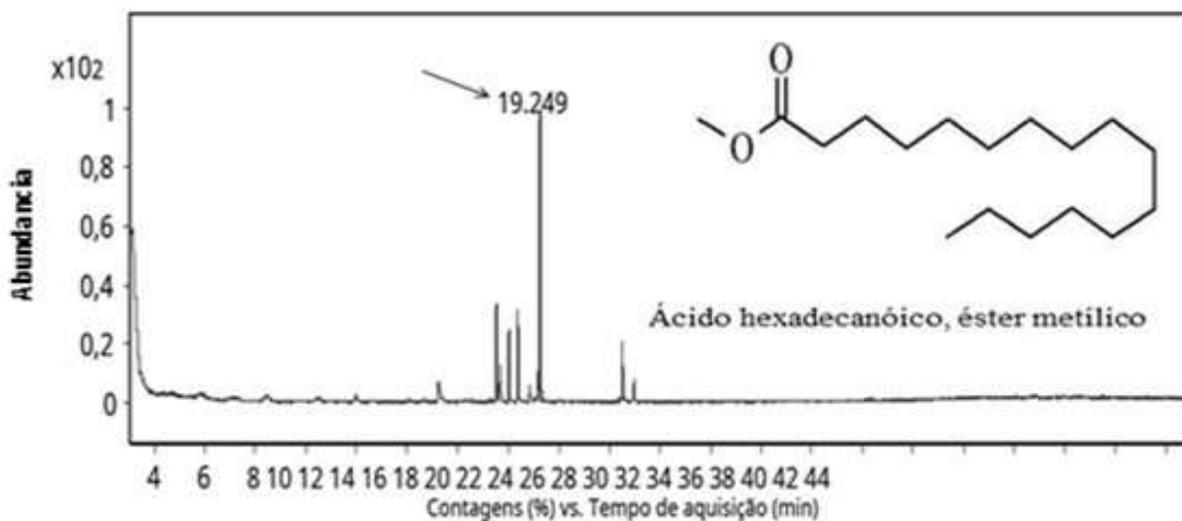
- Composto fitoquímico não identificado



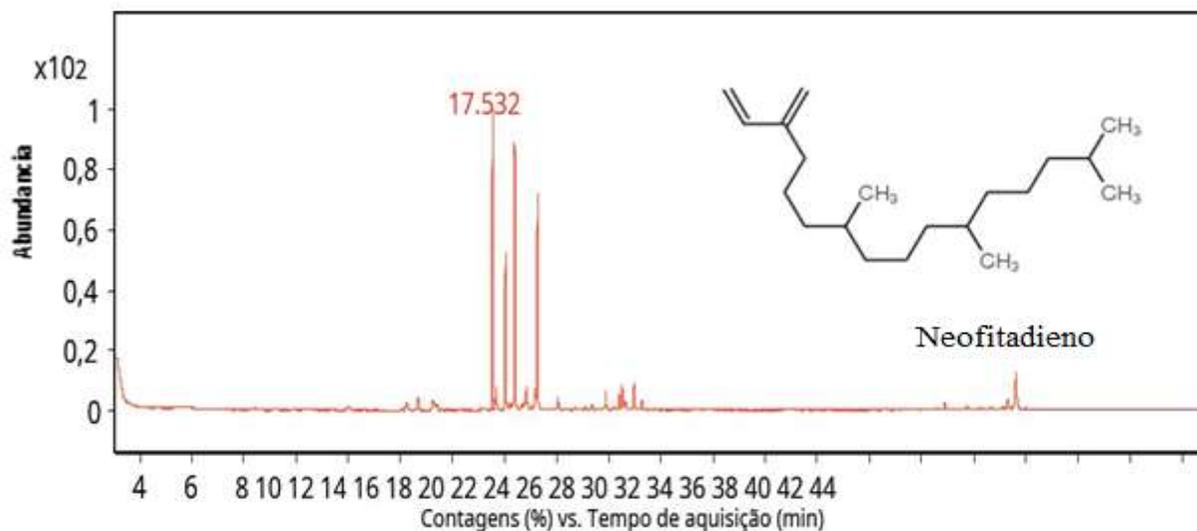
**Figura 20** - Tempo de aquisição e estrutura química do composto fitoquímico 3,7,11,15 - Tetrametil-2-hexadecen-1-ol.



**Figura 21** - Tempo de aquisição e estrutura química do composto fitoquímico Acetaldeído.



**Figura 22** - Tempo de aquisição e estrutura química do composto fitoquímico ácido hexadecanóico, éster metílico.



**Figura 23** - Tempo de aquisição e estrutura química do composto fitoquímico Neofitadieno.

Os gráficos acima mostram o tempo de aquisição (min) e a estrutura química dos compostos fitoquímicos identificados nos extractos metanólicos de *C. racemosa* e *S. ilicifolium*. O tempo de aquisição é o momento inicial de separação e identificação do composto fitoquímico. Cada composto fitoquímico apresenta um tempo de aquisição específico.

## 6. DISCUSSÃO

### 6.1. Actividade antimicrobiana de extractos metanólicos e hexanólicos de *C. racemosa* e *S. ilicifolium*

Os extractos metanólicos inibiram o crescimento de todos os microorganismos (*Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Candida albicans*) testados, com halos de inibição maiores em comparação com os extractos hexanólicos que somente inibiram o crescimento de *P. aeruginosa* e *C. albicans*. Segundo Rangaiah *et al.* (2010) Mostraram que, a extracção dos compostos bioactivos com metanol nas macroalgas, apresentaram maior actividade antimicrobiana em relação aos solventes acetado de etila e n-hexano. Em contraste, um estudo realizado por Petra *et al.* (2008) Mostraram que o acetado de etila, extraiu melhor os compostos bioactivos com actividade antimicrobiana nas algas (*Enteromorfa compressa*, *Chaetomorpha linum* e *Polisifonia subtilissima*), seguido de metanol e por último o n-hexano. Segundo Santos, (2021) O n-hexano é geralmente usado para a extracção de ácidos gordos como óleos e gorduras, essa preferência é devido as suas características peculiares como baixa polaridade, baixo ponto de ebulição que minimiza a decomposição do óleo e a eficiência de extrair o óleo desejado quase na sua totalidade.

O extracto metanólico de *C. racemosa* inibiu o crescimento de *S. aureus* e com o mesmo extracto preparado com o n-hexano não inibiu o crescimento da mesma cepa bacteriana. Resultados relacionados foram obtidos por Selem *et al.* (2011) A actividade antibacteriana de macroalga *S. dentifolium* foi observada no extracto obtido com acetato de etila, mas o mesmo não foi observada com outros solventes incluindo o metanol. Segundo Karthikaidevi *et al.* (2009) Que obtiveram resultados similares, sugeriram usar solventes específicos para extracção de compostos bioactivos com actividade antimicrobiana. Segundo Safafar *et al.* (2015) O metanol é um dos solventes mais usados para a extracção de compostos bioactivos polares com actividade antimicrobiana e antioxidante como é o caso de compostos fenólicos, cetonas, aldeídos, esterés e outros.

Vizzotto e Pereira, (2011) Compararam a influência de solventes n-hexano, acetona de etila, etanol, metanol e água na extracção de compostos fenólicos da Amora-preta (*Rubus sp*), eles observaram que, nos extractos que se usaram o n-hexano, não foram detectados compostos

fenólicos totais ao passo que, em extractos preparados com acetona de etila, etanol, metanol e água, os compostos fenólicos foram detectados, tendo sido mais detectados com solvente acetona, metanol e etanol. Segundo Liu *et al.*, (2011) Sugerem que solventes com polaridades muito baixa como n-hexano ou diclorometano, não são bons solventes para extrair compostos polares. Esses resultados mostram estar em concordância com os resultados obtidos nesse estudo o qual, os extractos metanólicos apresentaram maior actividade antimicrobiana frente aos microorganismos (*S. aureus*, *P. aeruginosa* e *C. albicans*) testados em relação aos extractos hexanólicos.

Quanto a *C. albicans*, extractos de *C. racemosa* metanólico inibiram o crescimento de *C. albicans*. Esses resultados estão em alinhamento com os resultados obtidos por Vlachos *et al.*, (1997) citados por Muhammed e Shameel, (2005) Mostraram que extractos de *C. racemosa*, *Halimeda cuneata* e *Codium prostratum* tratados com solvente metanol inibiram o crescimento de *C. albicans*.

Os resultados indicam que os diâmetros dos halos de inibição no controle positivo, que utilizou Nistitina, diminuíram com o tempo de incubação devido ao desenvolvimento de cepas resistentes a Nistitina. Isso sugere que a exposição prolongada a Nistitina pode levar a resistência fúngica. Por outro lado, os halos de inibição gerados pelos extractos de macroalgas metanólicos e hexanólicos permaneceram constantes, o que indica que os extractos mantiveram sua actividade antifúngica ao longo do tempo de incubação. Isso sugere que os extractos testados podem ser mais eficazes em longo período de tempo comparados a Nistitina, já que não resultaram na selecção de cepas resistentes.

Observamos que os extractos metanólicos e hexanólicos de *Sargassum ilicifolium* inibiram o crescimento de *P. aeruginosa*, *C. albicans* e não a *S. aureus*. Extractos metanólicos apresentaram maiores halos de inibição em relação aos extractos hexanólicos frente a *P. aeruginosa*, *C. albicans*. Resultados similares foram obtidos por Al-Hashdy *et al.* (2022) Extractos metanólicos de *Sargassum ilicifolium* inibiram o crescimento de *P. aeruginosa*, *Bacillus subtilis* e *Escherichia coli* excepto o *S. aureus*. Em contraste com os resultados obtidos por Thalissa, (2023) que reportou que o extracto metanólico de *S. ilicifolium* inibiu apenas o crescimento de *S. aureus* e não o crescimento de *P. aeruginosa*.

## **6.2. Actividade antimicrobiana de extractos de *C. racemosa* e *S. ilicifolium* macerados por 24 e 48 horas**

Os extractos macerados por 48 horas inibiram o crescimento de todos os microorganismos (*Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Candida albicans*) testados nesse estudo. Em contraste com os extractos macerados por 24 horas que apenas inibiram o crescimento de *C. albicans* com halo médio de inibição de 8.33 mm. Os resultados obtidos estão alinhados com os resultados obtidos por Sun *et al.*, (2011) Envolvendo estudos com folhas de uma espécie de planta *Ilex kudingcha*, foi observado que o tempo de maceração de folhas de *Ilex kudingcha* influenciou directamente a concentração final dos compostos bioactivos e a actividade antimicrobiana. Resultados similares foram obtidos por Vongsak *et al.*, (2013) Em estudo realizado com cascas de *Moringa oleifera*, foi relatado que, a aplicação de maior tempo de contacto entre o solvente metanol e a casca de *Moringa oleifera*, facilitou a penetração do solvente no material vegetal e consequentemente a extracção de compostos bioactivos com maior eficiência em extractos preparados com maior tempo de maceração.

Resultados relacionados foram obtidos por Yingngam *et al.*, (2015) Foi observado que, tempos reduzidos de maceração não permitem a penetração eficiente do solvente no material vegetal, impedindo no entanto, a extracção dos compostos bioactivos de interesse. Outro estudo realizado por Lapornik *et al.*, (2005) Usando resíduos de frutas vermelhas extraídos em 1, 12 e 24 h, os resultados mostraram que, os compostos bioactivos diminuíram no extracto preparado com menor tempo de maceração em relação aos extractos preparados com maior tempo de maceração.

Esses resultados corroboram estreitamente com os resultados obtidos neste presente estudo, pois os extractos macerados por 48 horas, apresentaram maior actividade antimicrobiana em todas cepas microbianas testadas com maiores halos de inibição em comparação com os extractos macerados por 24 horas.

### **6.3. Compostos fitoquímicos dos extractos metanólicos de *C. racemosa* e *S. ilicifolium***

Os grupos funcionais dos compostos fitoquímicos presentes em macroalgas influenciam directamente a actividade antimicrobiana segundo a ordem crescente da polaridade: fenóis > aldeídos > cetonas > álcoois > esterres > hidrocarbonetos (Nunes *et al.*, 2015). A actividade antimicrobiana das macroalgas pode ser devido a acção específica de grupos de compostos fitoquímicos presentes em macroalgas ou interacção sinérgica de vários compostos de diferentes grupos funcionais (Ribeiro, 2020). Espécies de macroalgas como do género *Caulerpa spp*, mostraram que a actividade antibacteriana estava directamente relacionada com a interacção de vários compostos como saponinas, flavonóides, fenóis, ácidos carboxílicos, hidrocarbonetos, cetonas, esterres, álcoois, aldeídos e outros compostos (Arham *et al.*, 2016).

As análises fitoquímicas realizadas pela técnica de GC-MS nos extractos metanólicos de *C. racemosa* e *S. ilicifolium*, revelaram a presença de vários compostos fitoquímicos, entre os quais Neophytadiene, Acetaldeído, 3,7,11,15 - Tetrametil-2-hexadecen-1-ol e ácido hexadecanóico. Os extractos metanólicos de *C. racemosa* revelaram maior diversidade de compostos fitoquímicos identificados com 18 compostos em relação aos extractos metanólicos de *S. ilicifolium* que foram identificados apenas 05 compostos.

Os álcoois presentes em produtos naturais são conhecidos por possuir actividade bactericida frente a bactérias vegetativas, esses compostos actuam na desnaturação proteica nas células bacterianas, actuam também como substância desidratante (Suppakul *et al.*, 2002 citado por Valeriano *et al.*, 2012). O fitol ou 3,7,11,15-Tetrametil-2-hexadecen-1-ol é um álcool diterpénico acíclico encontrado em plantas e algas, esse composto é precursor da vitamina E e K3 e foi relatado actividade antimicrobiana frente a *Staphylococcus aureus* e *Ganoderma boninense* (Dias *et al.*, 2020).

O composto Acetaldeído ou óxido de etileno pertencente aos aldeídos, apresentou acção bacteriolítico, agindo na destruição da parede celular das bactérias aeróbias Gram negativas, positivas e bacilos formados de esporos aeróbios e anaeróbios e agiu também contra os fungos (Gomes, 2006). Em estudos realizados por Ganesamoorthy e Ganesan, (2016) Demonstraram que, o fitocomposto Acetaldeído apresentava actividade antibacteriana frente a bactérias *S. aureus* e

*P. aeruginosa*. Estes resultados estão em concordância com os resultados obtidos nesse estudo, pois os compostos Acetaldeído e 3,7,11,15 - Tetrametil-2-hexadecen-1-ol foram identificados somente nos extractos metanólicos de *C. racemosa*, que por sinal, foi a espécie que inibiu o crescimento de todos os microorganismos testados (*S. aureus* e *P. aeruginosa* e *C. albicans*). Em contraste com os extractos metanólicos de *Sargassum ilicifolium* que não foram detectados.

Os esteres presentes em produtos naturais tem capacidade de hidrolisar polissacarídeos presentes na parede celular bacteriana, alguns dos polissacarídeos hidrolisados são N-acetil-D-glicosamina e o ácido-acetilmuramico (Oliveira, 2005). O Ácido hexadecanóico, éster metílico é um dos principais compostos presentes nos óleos essenciais das plantas, esse composto é responsável pela actividade antibacteriana (Reid *et al.*, 2005; Gomes, 2006).

Segundo estudo realizado por Gomes, (2018) Foi relatado que a mistura de esteres derivados da planta Mamona, inibiram o crescimento de bactérias Gram positivas como *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermitis*. O Neofitadieno é um diterpeno produzido pela desidratação do 3,7,11,15 - Tetrametil-2-hexadecen-1-ol (Gago 2016), esse composto exhibe actividade antimicrobiana (Morais *et al.*, 2015).

Segundo Pires *et al.*, (2012) o diterpeno neofitadieno isolado do extracto etanólico de macroalga do género *Himanthalia* exibiu actividade antifúngica frente a *Aspergillus niger*, *Cladosporium cladosporioides* e *Candida albicans*. Neste estudo, os extractos metanólicos de *C. racemosa* e *S. ilicifolium* revelaram presença de Ácido hexadecanóico, éster metílico e Neofitadieno, que por sinal, todos os extractos inibiram o crescimento de *P. aeruginosa* e *C. albicans*.

É importante referir, que a técnica de GC-MS permite identificar apenas os compostos fitoquímicos através da comparação dos espectros de massa e tempo de aquisição contidas no banco de dados da NIST 2014. Essa técnica é limitada na identificação de outros compostos que não constam no banco de dados da NIST 2014, o que resulta na ausência de identificação de outros compostos possivelmente relevantes, incluindo aqueles com actividade antimicrobiana. Nesse estudo, foram revelados 47 e 32 compostos fitoquímicos nos extractos metanólicos de *C. racemosa* e *S. ilicifolium*, respectivamente. Contudo, apenas 18 e 05 compostos fitoquímicos foram identificados nos extractos metanólicos de *C. racemosa* e *S. ilicifolium* respectivamente.

A discrepância dos resultados obtidos neste estudo em relação aos resultados obtidos por outros autores podem estar relacionados com vários factores como a técnica de extracção dos compostos bioactivos, a natureza do vegetal, o local da colheita, o tamanho das partículas do material, o tipo de solvente impregnado, o tipo de secagem, o tempo de contacto entre o extracto e o solvente (maceração), a temperatura do processo, esses factores influenciam directamente na obtenção de compostos bioactivos com propriedades farmacológicas desejadas (Vongsak *et al.*, 2013).

## 7. CONCLUSÃO

Diante dos resultados obtidos, conclui-se que:

- O solvente metanol mostrou maior eficiência na extracção de compostos bioactivos e maior actividade antimicrobiana frente as cepas de *S. aureus*, *P. aeruginosa* e *C. albicans* e a macroalga *Caulerpa racemosa* mostrou maior actividade antimicrobiana, apresentando valores médios de diâmetros dos halos de inibição variando de 8.53 a 29.79 mm.
- O tempo 48 horas mostrou ser o melhor tempo de maceração para extracção de compostos bioactivos com actividade antimicrobiana frente as cepas de *S. aureus*, *P. aeruginosa* e *C. albicans*.
- As análises fitoquímicas realizadas nos extractos metanólicos de macroalgas *Caulerpa racemosa* e *Sargassum ilicifolium* pela técnica de GC-MS, revelaram a presença de 23 compostos fitoquímicos, incluindo, Neophytadiene, Acetaldeído, 3,7,11,15 - Tetrametil-2-hexadecen-1-ol e ácido hexadecanóico. O extracto metanólico de *C. racemosa* revelou maior diversidade de compostos fitoquímicos identificados com 18 compostos em relação aos extractos metanólicos de *S. ilicifolium* que apresentou apenas 05 compostos fitoquímicos.

O tempo de maceração assim como o tipo de solvente empregue para a extracção de compostos bioactivos com actividade antimicrobiana influenciaram directamente os resultados obtidos nesse presente estudo. Portanto, esses factores são muito importantes a ter em conta, principalmente quando o objectivo é obter extractos com propriedades antimicrobianos.

## **8. LIMITAÇÕES**

Durante a realização do estudo:

- A medição de halos de inibição com formação irregular na *Candida albicans*, mostrou-se como factor limitante. Para contornar essa limitação, com auxílio de um paquímetro mediu-se os pontos específicos na placa onde o halo de inibição estava presente;
- A visualização de halos de inibição na *Pseudomonas aeruginosa* mostrou-se também como factor limitante, devido a produção de um pigmento fluorescente verde chamado pioverdina. Para melhor visualizar e posterior medir os halos de inibição, a placa foi aberta e exposta a uma fonte de luz, o que permitiu a visualização e medição de halos de inibição.

## **9. RECOMENDAÇÕES**

Para futuras pesquisas, recomenda-se:

- Extrair compostos bioactivos com mistura de solventes polares e apolares de modo a aumentar a eficiência na extracção de compostos bioactivos com actividade antimicrobiana;
- Realizar extracção dos compostos bioactivos por tempo superior á 48 horas de modo a obter extractos com maior actividade antimicrobiana;
- Determinar a concentração inibitória mínima dos extractos metanólicos de macroalga *Caulerpa racemosa* e *Sargassum ilicifolium*.

## 10.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Al-Hashdy. D., Raweh. S., El-Shaibany., Humaid. Abdulrahman., El-Aasser. Mahmoud. (2022). Desenvolvimento em Farmácia e Ciências da Vida. *Res Dev Pharm L Sci*. 8<sup>a</sup> Edição. 8. (3).
2. Araújo. S. K. R., Frota. A. C. V., Santana. S. M., Souza. R. N. (2023). Risco emergente das infecções fúngicas invasivas: *Revista Ibero-Americano de Humanidade, Ciências e Educação*. Volume. 9. ISSN-2675-3375.
3. Arham. R., Mulyati. M., Tahirc. M., Syamsuar. S. (2016). Analysis of bioactive compounds of *Caulerpa racemose*, *Sargassum ssp* and *Gracilaria verrucosa* using different solvents, *Journal Technology. Sciences and Engineering*. 78: 4-2.
4. Bandeira. S.O. (2002). Diversity and distribution of seagrasses around Inhaca Island. Southern Mozambique. *S. Afr Jardim Botânico*. 68: 191-198.
5. Bonesso. M. F. (2011). *Determinação da Virulência e da Resistência Antimicrobiana em Staphylococcus spp. Isolados de Pacientes do Serviço de Dermatologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu*, SP. Tese de mestrado. 96pp. São Paulo. Universidade Estadual Paulista.
6. Białek. A., Stawarska. A., Bodecka. J., Białek. M., Tokarz. A. (2017). Pomegranate seed oil influences the fatty acids profile and reduces the activity of desaturases in livers of sprague-dawley rats. *Prostaglandins and Other Lipid Mediators*. v. 131. p. 9-16.
7. Cassicai. T. M. (2012). *Avaliação nutritiva de frutas nativas da Ilha de KaNyaka*, Tese de Licenciatura. 92pp. Maputo, Universidade Eduardo Mondlane.
8. Carvalho. M. A., Bandeira. S. O. (1998). Flora de algas marinhas do Arquipélago das Quirimbas, norte de Moçambique. *Algas das Quirimbas*.
9. Carneiro. V. A. R., Oliveira-Carvalho. M. F., Brito. J. O. F., Lima. F. E. G. Q., Guedes. E. A. C. (2019). Ocorrência e distribuição do género *Caulerpa*. J.V. Lamour. (Bryopsidales - Chlorophyta) no Estado de Alagoas, *Hoehnea*, 2-8.
10. Cruz. G. P. A. (2023). *Recuperação de compostos bioactivos a partir de residuos da indústria Vitivícola*, Tese de doutoramento. 228 pp. Rio de Janeiro, Universidade Federal do Rio de Janeiro.

11. Dalmolin. J., Nakano. R. L., Marcusso. P., Boleta. C. D. C. F., Cogo. J., Brassalli de Melo. P., Zardeto. G. (2022). Mecanismo de expressão de resistência aos antibióticos e saúde pública. *Arquivos de Ciências da Saúde da UNIPAR*, V. 26, n. 3, 681-692.
12. De Sousa. C. K. (2017). Actividades antioxidante, antimicrobiana, antibiofilme e citotóxica de extractos da macroalga marinha parda *Lobophora variegata* (J. V. Lamouroux), Tese de Mestrado. 101 pp, Rio de Janeiro, Universidade Federal Do Ceará.
13. De Freitas. P. L. A. (2003). *Resistência e Tipagem de Pseudomonas aeruginosa isolada de Pacientes Hospitalizados em Porto Alegre*, Tese de Doutorado. 156pp. Porto Alegre. Universidade Federal do Rio Grande do Sul.
14. Dos Santos. D. V. A., Alves de Oliveira. G., Pacheco. L. G., Faria. L. M. O., Claro da Cunha. J. Mello. T. M. (2018). Antibióticos através da abordagem do mecanismo de resistência bacteriana. *Revista Científica Multidisciplinar das faculdades São José*, V. 11. ISSN : 2317-1499.
15. Dias. V., Bandeira. S. O., Chaúque. E., Lipassula. M., Mussagy. A. (2020). Evaluation of Phytocompounds and Chemical Elements Present In Selected Species of Seaweeds, to Sustain Future Quantitative Analysis for Bioactive Compounds. *Inhaca Island*: 232-239.
16. Do Nascimento. S. J. M., Calado. J. P. L., Barros. A. V., Da Silva. M. E. M., De Souza. B. S., Rorigues. W., Quintas. J. M., Dos Santos. J. C. B. (2022). Novas abordagens terapêuticas: Compostos antimicrobianos produzidos por algas marinhas. *Research, Society and Development*, V. 11, (2525-3409).
17. Duarte. M. C. T., Figueira. G. M., Pereira. B. (2004). Actividade antimicrobiana de extractos hidroálcolicas de espécies de plantas medicinais CPQBA/Unicamp. *Rev. Bras.Farmacogn.* 14 (1): 6-8.
18. Dzidic. S., Suskovic. J., Kos. B. (1999). Antibiotic Resistance Mechanisms in Bacteria: Biotious Diseases. *Convergence and Synthesis. Science*, V. 283 P: 806-809.
19. Fajardo. N. C., Cornejo. X. (2020). Uma revisão actualizada de macroalgas marinhas equador continental. *Rev. Científico Centenas*, (2): 201-209.
20. Fernando. R. J. (2021). *Avaliação da Actividade Anti-microbiana dos extractos metanólicos de macroalgas Halimeda cuneata, Codium prostratum e Caulerpa racemosa frente as bactérias Staphylococcus aureus e Pseudomonas aeruginosa*, tese de Licenciatura. 77 pp. Maputo, Universidade Eduardo Mondlane.

21. Fithriani. D. (2015). Oportunidades e desafios para o desenvolvimento *Caulerpa racemosa* as alimentos funcionais. Volume 1, *Food and Chemical Toxicology*, 97:297-306.
22. Figueredo. F. C. A., De Freitas. N. L., Dalmolin. T. V., Brandão. F. (2021). *Pseudomonas aeruginosa*: overview of the profile of resistance to carbapenems in Brazil. *Brazilian Journal of Development*, v.7, n.1, p. 9661-9672.
23. Food and agriculture Organization. (2020). Food safety and quality: *World Antimicrobial Awareness Week*.
24. Gago. S. A. (2016). *Compostos bioactivos de macroalgas com interesse no tratamento de diabetes*. Tese de Mestrado. 59pp. Algarve, Universidade do Algarve.
25. Gomes. L. F. (2018). *Estudo fitoquímico e actividade insecticida de composição fitossanitária de Annona squamosa L. e Annona Squamosa*. Tese de Doutoramento. 159pp. Rio Largo. Universidade Federal de Alagoas.
26. Gomes. P. B. (2006). *Química e actividade antimicrobiana de Manilkara huberi (macaranduba)*. Tese de Mestrado. 158pp, Pernambuco, Universidade Federal de Pernambuco.
27. Granham. L. E., Granham. J. M., Wilcox., L. W. (2009). *Algae*. 2. Ed, 450pp. São Francisco: Pearson Education.
28. Hogue. A. M. (2007). Diagnoses of Mozambique Coastal Zone. *Revista de Gestão Costeira Integrada*. 69-82.
29. Hickl. J., Argyropoulou. A., Sakavitsi. M. E., Halabalaki. M., Al-Ahmad. A., Hellwig. E., Aliogiannis. N., Skaltsounis. A. L., Wittmer. A., Vach. K., Karygianni. L. (2018). Mediterranean herb extracts inhibit microbial growth of representative oral microorganisms and biofilm formation of *Streptococcus mutans*. *PLoS ONE*, 13 (12).
30. Henriques. A., Vasconcelos. C., Cerca. N. (2013). Importância dos biofilme nas infecções nosocomiais - o estado da arte. *Arquivos de medicina*. 27-36.
31. Hudzicki. J. (2009). Protocolo de testes de susceptibilidade á difusão em disco Kirby-Bauer. *Sociedade Americana de Microbiologia*.
32. João. A. A. (2015). *Avaliação da Actividade Antimicrobiana das Raízes de Asparagus Plumosus baker e Asparagus africanus*. Tese de Licenciatura. 56 pp. Maputo, Universidade Eduardo Mondlane.

33. Karthikaidevi. G., Manivannan. K., Thirumaran. G., Anantharaman. P., Balasubaramanian. T. (2009). Propriedades antibacterianas de algas verdes seleccionadas das águas costeiras de Vedalai; Reserva da Biosfera Marinha do Golfo de Mannar *Global Journal Pharmacol*, (2): 107-112.
34. Kaper. J. B., Natano. J. P., Mobley. L. (2004). Pathogenic Escheichia coli. *Nature Reviewws Microbiology*. 2: 123-140.
35. Kolanjinathan. K., Ganesh. P., Saranraj. P. (2014). Pharmacological Importance of Seaweeds, *World Journal of Fish and Marine Sciences* (1): 01-15.
36. Landers. T. F., Cohen. B., Wittum. T. E., Larson. E. L. (2012). A review of antibiotic use in food animals: perspective, policy, and potential. *Public Health Reports*, v. 127, p. 4-34
37. Lapornik. B., Prosek. M., Wondra. A. G. (2005). Comparison of extracts prepared from plant by-products using different solvents and extraction time. *Journal of Food Engineering*, v. 71, n. 2, p. 214-222.
38. Liu. F. F., Ang. C. Y. W., Springer. D. (2011). Optimization of extraction conditions for active components in Hypericum perforatum using surface methodology. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. v. 48, p. 3.364-3.371.
39. Mahaluca. F. A. (2018). *Perfil da resistência antibacteriana na unidade de cuidados intensivos pediátricos e cuidados intermédios dos adultos do Hospital Central de Maputo*. Tese de Mestrado. 199pp. Kwazulu, University of Kwazulu Natal.
40. Martins. R. M. (2014). *Actividade antimicrobiana e Citotóxica de Macroalgas da Antartica*, Tese de mestrado. 65pp. São Paulo, Universidade Federal de Pelotas.
41. Mehra. R., Bhushan. S., Bast. F., Singh. S. (2019). Macroalga marinha Caulerpa: papel de seus metabólitos na modulação da sinalização do câncer. *Relatórios de Biologia Molecular*, 3545 – 3555.
42. Morais. M. G., Vaz. B. S., Morais. E. G., Costa. J. A. V. (2015). Biologically active Metabolites Synthesized by Microalgae. *BioMed Research International*: 1-15.
43. Monteiro. L. G. S., Zimba. T. F., Sidat. M. M. (2015). Padrão de sensibilidade aos antimicrobianos de enterobacteriaceae isoladas no hospital central de Maputo, *Rev. Cient. UEM: Sér. Ciênc. bioméd. Saúde pública* Vol. 1, No 1, pp 7-13.
44. Monteiro. J. M., Albuquerque. U. A., Araújo. E. L. (2005). Taninos: uma abordagem da química a ecologia. *Química Nova*, (5): 892-896

45. Murray. R. P. Rosenthal. S. K. Pfaller. A. M. (2010). *Microbiologia Medica*. 6ª Edição, 4393pp. Rio de Janeiro. Elsevier Editora Ltda.
46. Murray. R. P., Rosenthal. S. K., Pfaller. A. M. (2006). *Microbiologia Medica*. 5ª Edição, Rio de Janeiro. Elsevier Editora Ltda.
47. Muhammad. A. R., Shameel. M. (2005). Pharmaceutical biology of seaweeds from the Karachi coast of Pakistan. *Pharmaceutical Biology*, (2):97-107.
48. Nikolic. F., Mudgil. P. (2023). A parede celular, a membrana celular e os factores de virulência de Staphylococcus aureuse seu papel na resistência aos antibióticos. *Editora Académica*.
49. Nins. P. O. (2023). *Principais mecanismos de resistência de Candida albicans e de espécies de Candidas não albicans: uma revisão*, Tese de Bacharel. 49pp, Universidade Federal de Ouro Preto.
50. Nunes. B. C., Martins. M. M., Morais. S. A. L., Martins. C. H. G., Ambrósio. M. A. L. V., L. Cunha. C. S., De Oliveira. A., Chang. R., Nascimento. E. A., De Aquino. F. J. T. (2015). Atividades antimicrobiana e antifúngica do óleo essencial das folhas da espécie, *Sociedade Brasileira de Química ( SBQ)*, CEP 18707-150.
51. Oliveira. E. C., Österlund. K., Mtolera. M. S. P. (2005). Marine plants of Tanzania. A field guide to the seaweeds and seagrasses. In: *Botany Departament, Stockholm University*.
52. Padilha. R. J. S. A. (2014). *Perfil Químico e Actividade Antimicrobiana de Caulerpa racemosa (Forsskal) J. Agardh*. Tese de Mestrado. 84pp. Pernambuco, Universidade Federal de Pernambuco.
53. Patra. J. K., Rath. S. K., Jena. K., Rathod. V. K., Thatoi. H. (2008). Avaliação de Actividade antioxidante e antimicrobiana de algas marinha (Sargassum sp.): Um Estudo sobre a Inibição da Actividade da Glutathione-S-Transferase. *Turk J. Biol.*, 32: 119-125.
54. Pereira. R. J., Do Nascimento. L. N. G. (2014). *Compostos Bioactivos Vegetais*. Palmas
55. Pereira. R. C. Soares-Gomes. A. (2021). *Biologia Marinha*. In. *Cap. Produção primária marinha*. Editora Interciência.
56. Pinteus. S. F. G. (2011). *Avaliação da capacidade antioxidante e antimicrobiana em algas da costa de Peniche* : Identificação de compostos bioactivos com elevado potencial biotecnológico. Tese de Mestrado. 86pp. Porto, Universidade do Porto.

57. Pimentel. F. B., Alves. R. C., Rodrigues. F., Oliveira. M. B. P. (2018). Macroalgae-Derived Ingredients for Cosmetic Industry, *Cosmetics*. 5: 2.
58. Preziosi. M., Lee. D. M. K., Thomas. S., Paiva. C., Bene. R., Libra. T., Lopes. H., Kalkhoff. S., Prathap. V., Akrami. V. K., Normahmed. V. (2015). Um estudo observacional prospectiva de bacteremia em adultos internados em hospital urbano de Moçambique, *S Afr Med J*. (5): 370-373.
59. Ramalho. H. F., Suarez. P. A. Z. (2013). A química dos óleos e gorduras e seus processos de extracção e refino. *Revista Virtual Química*, v. 5, n. 1, p. 2-15.
60. Raven. P. H., Evert. R. F., Eichhorn. S. E. (2007). *Biologia Vegetal*. 7 ed. 234 pp. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan.
61. Rangaiah. S. G., Lakshmi. P., Manjula. E. (2010). Actividade antimicrobiana de algas marinhas Gracilária, Padinae Sargassum ssp. Sobre aspectos clínicos e fitopatógenos. *Internacional J. Química. Anal. Ciências*, 1 (6):114-117.
62. Reid. K. A., Jager. A. K., Van. S. J. (2005). Fharmacology and phytocgemical properties of Dombeya Rotundifolia. *South Africa Journal of Botany*, 67: 349-353
63. Russel. J. B. (1994). *Química Geral*. Cap. 1, p.511-512. São Paulo.
64. Safafar. H., Wagenen. J. V., Moller. P., Jacobsen. C. (2015). Carotenoids, phenolic compounds and tocopherols contribute to the antioxidative properties of some microalgae species grown on industrial wastewater. *Marine Drugs*, Basel, v. 13, p. 7339-7356.
65. Santos. J. M. (2021). *Óleo de sementes de romã (Punica granatum L): Métodos de extracção e perfil de ácidos graxos*. Tese de Licenciatura. 54pp. Sergipe, Universidade Federal de Sergipe.
66. Selem. W. M., Galal. H., Nasr El-deen. F. (2011). Triagem de actividade antibacteriana em alguns ambientes marinhos, algas do mar Vermelho (Hurghata, Egito). *Jornal Africano de Pesquisa em Microbiologia* Vol. 5 (15).
67. Silva. M. L. C., Costa. R. S., Santana. A. S., Koblitz. M. G. B. (2010). Compostos fenólicos, carotenóides e actividade antioxidante em produtos vegetais. *Ciências Agrárias*, Londrina, v. 31, n. 3, p. 669-682.

68. Sun. Y., Xu. W., Zhang. W., Hu. Q., Zeng. X. (2011). Optimizing the extraction of phenolic antioxidants from kudingcha made from Ilex kudingcha. *Separation and Purification Technology*, 78(3), 311-320.
69. Thalisia. C., Thiago. M., Vale. N., Cavalcanti. P., Elisabete. B., Roberto. C., Martins. C., Johana. M., Obando. C., (2022). Metabólitos Bioativos e Aplicações Biotecnológicas de Macroalgas do Gênero Sargassum: *Uma Revisão*. CEP 11350-011.
70. Tortora. G. J., Funke. B. R., Case. C. L. (2012). *Microbiologia*, 10<sup>a</sup> Edição, 967pp. São Paulo – SP. Artmed Editora.
71. Trigui. M., Gasmi. L., Imen Zouari. I., Tounsi. S. (2013). Seasonal variation in phenolic composition, antibacterial and antioxidant activities of *Ulva rigida* (Chlorophyta) and assessment of antiacetylcholinesterase potential. *J Appl Phycol*. 319 – 328.
72. Valeriano. C., Piccoli. R. H., Cardoso. M. G., Alves. E. (2012). Actividade antimicrobiana de óleos essenciais em bactérias patogênicas de origem alimentar, *Rev. Bras. Pl. Med.* v.14, n.1, p.57-67
73. Vidotti. E. C., Rollemberg. M. C. E. (2004). Algas: da economia nos ambientes aquáticos à biorremediação e à química analítica. *Química Nova*, v. 27, n. 1, p. 139-145.
74. Vizzotto. M., Pereira. M. C. (2009). Metodologia Científica: Optimização do processo de extracção de compostos fenólicos Antioxidantes de Martilo (*Vaccinium ashei* Reade). *Boletim de pesquisa e desenvolvimento*. 1. ed. ESSN, 1981-5980.
75. Vongsak. B., Mangkool. S. Thongpraditchhota. S., Wongkrajang. Y., Gritsanapan. W. (2013). Maximizing total phenolics, total flavonoids contents and antioxidant activity of *Moringa oleifera* leaf extract by the appropriate extraction method. *Industrial Crops and Products*, v. 44, p. 566–571.
76. WHO (2022). *Fungal priority pathogens list to guide research, development and public health action*
77. Yanishlieva. M. N. V. (2001). Antioxidants in food: *Practical applications*, edição: Jan Pokorny.
78. Ye. L., Zhang. J., Xiao. W. (2020). Eficácia e mecanismo de acções de produtos naturais medicamentos antimicrobianos. *Farmacol. Lá.* 216,107671.

## 11. ANEXOS

**11.1.** As figuras em anexo foram obtidas por meio da imagem fotográfica feita pelo autor durante a realização do trabalho.



**Anexo 1**-Preparo das macroalgas para secagem no DCB. **Anexo 2**-Trituração das macroalgas no Laboratório de Engenharia de Moçambique (LEM).



**Anexo 3**-Homogeneização, Dept. Química.

**Anexo 4**-Filtração da solução no dept. Química.

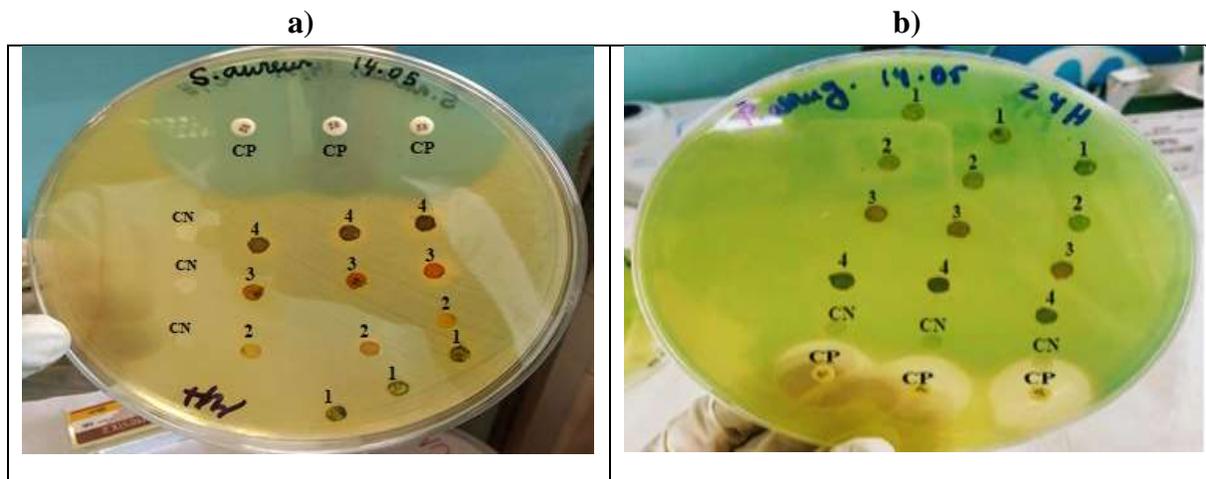


**Anexo 5**-Evaporação do solvente no dept Química. **Anexo 6**-Extractos prontos Faculdade de Medicina



**Anexo 7**-Subcultivo dos microorganismos (*P. aeruginosa*, *C. albicans* e *S. aureus*). **Anexo 8**-Preparação dos discos para impregnação dos extractos na Faculdade de Medicina.

**11.2.** Ensaio microbiológicos dos extractos metanólicos e hexanólicos das macroalgas macerados por 24 e 48 horas frente a *S. aureus*, *P. aeruginosa* e *C. albicans*.



**Anexo 9.** Teste de sensibilidade aos extractos metanólicos e hexanólicos macerados por 24 horas frente a *S. aureus* e *P. aeruginosa* respectivamente.



**Anexo 10.** Teste de sensibilidade aos extractos metanólicos e hexanólicos macerados por 48 horas frente a *P. aeruginosa* e *C. albicans* respectivamente.

### 11.3. Análise estatística

**Anexo 11:** Comparação da actividade antimicrobiana de extractos metanólicos de *Caulerpa racemosa* macerados em dois tempos (24 e 48 horas) frente a bactéria *Staphylococcus aureus*.

Tempo de maceração		
Valores de halos de inibição (mm)		
Réplicas	Extracto metanólico de <i>C. racemosa</i> macerado por 24 horas	Extracto metanólico de <i>C. racemosa</i> macerado por 48 horas
1	0	12.6
2	0	12.2
3	0	8.7

*t*-Test: Two-Sample Assuming Unequal Variances

	Variable 1	Variable 2
<b>Mean</b>	<b>0</b>	<b>11.16666667</b>
<b>Standard deviation</b>	<b>0</b>	<b>2.14447610</b>
Observations	3	3
Hypothesized Mean Difference	0	
Df	2	
t Stat	-9.01463128	
<b>P(T&lt;=t) one-tail</b>	<b>0.006041527</b>	
t Critical one-tail	2.91998558	
P(T<=t) two-tail	0.012083053	
t Critical two-tail	4.30265273	

**Interpretação dos resultados:** Há diferenças significativas nos diâmetros dos halos de inibição entre os extractos metanólicos de *Caulerpa racemosa* macerados por 24 e 48 horas,  $P_{0,006} < 0,05$ , deste modo, rejeita-se a hipótese nula.

***Avaliação da Actividade Antimicrobiana de diferentes Extractos de Macroalgas Sargassum ilicifolium e Caulerpa racemosa Colectadas na Ilha de Inhaca, Província de Maputo***

---

**Anexo 12.** Comparação da actividade antimicrobiana de extractos de macroalga *Caulerpa racemosa* preparados com dois solventes diferentes (Metanol e n-hexano) e macerado por 48 h frente a bactéria *Staphylococcus aureus*

Tipo de solvente		
Valos de halos de inibição (mm)		
Réplicas	Extracto metanólico de <i>C. racemosa</i> macerado por 48 h	Extracto hexanólico de <i>C. racemosa</i> macerado por 48 h
1	12.6	0
2	12.2	0
3	8.7	0

*t-Test: Two-Sample Assuming Unequal Variances*

	Variable 1	Variable 2
<b>Mean</b>	<b>11.16666667</b>	<b>0</b>
<b>Standard deviation</b>	<b>2.14447610</b>	<b>0</b>
Observations	3	3
Hypothesized Mean Difference	0	
df	2	
t Stat	9.01463128	
<b>P(T&lt;=t) one-tail</b>	<b>0.006041527</b>	
t Critical one-tail	2.91998558	
P(T<=t) two-tail	0.012083053	
t Critical two-tail	4.30265273	

**Interpretação dos resultados:** Há diferenças significativas nos diâmetros dos halos de inibição entre os extractos metanólicos e hexanólicos de macroalga *Caulerpa racemosa* macerados por 48 horas,  $P_{0,006} < 0,05$ , deste modo, rejeita-se a hipótese nula.

***Avaliação da Actividade Antimicrobiana de diferentes Extractos de Macroalgas Sargassum ilicifolium e Caulerpa racemosa Colectadas na Ilha de Inhaca, Província de Maputo***

---

**Anexo 13.** Comparação da actividade antimicrobiana de extractos de macroalga *Caulerpa racemosa* tratado com n-hexano e macerados em dois tempos distintos (24 e 48 horas) frente a bactéria *Pseudomonas aeruginosa*

Tempo de maceração		
Valores de halos de inibição (mm)		
Réplicas	Extractos hexanólico de <i>C. racemosa</i> macerado por 24 horas	Extractos hexanólico de <i>C. racemosa</i> macerado por 48 horas
1	0	14.09
2	0	14.38
3	0	14.38

*t-Test: Two-Sample Assuming Unequal Variances*

	Variable 1	Variable 2
<b>Mean</b>	<b>14.28333333</b>	<b>0</b>
<b>Standard deviation</b>	<b>0.16733200</b>	<b>0</b>
Observations	3	3
Hypothesized Mean Difference	0	
Df	2	
t Stat	147.7586207	
<b>P(T&lt;=t) one-tail</b>	<b>2.28999E-05</b>	
t Critical one-tail	2.91998558	
P(T<=t) two-tail	4.57999E-05	
t Critical two-tail	4.30265273	

**Interp**

**retação dos resultados:** Há diferenças significativas nos diâmetros dos halos de inibição entre os extractos hexanólicos de macroalga *Caulerpa racemosa* macerados por 24 e 48 horas,  $P_{2.28999E-05} < 0,05$ , deste modo, rejeita-se a hipótese nula.

***Avaliação da Actividade Antimicrobiana de diferentes Extractos de Macroalgas Sargassum ilicifolium e Caulerpa racemosa Colectadas na Ilha de Inhaca, Província de Maputo***

---

**Anexo 14.** Comparação da actividade antimicrobiana de extractos de macroalga *Caulerpa racemosa* preparados com dois solventes diferentes (Metanol e n-hexano) e macerado por 48 h frente a bactéria *P. aeruginosa*.

Tipo de solvente		
Valores de halos de inibição (mm)		
Réplicas	Extracto metanólico de <i>C. racemosa</i> macerado por 48 h	Extracto hexanólico de <i>C. racemosa</i> macerado por 48 h
1	28.09	14.09
2	28.09	14.38
3	33.19	14.38

*t-Test: Two-Sample Assuming Unequal Variances*

	Variable 1	Variable 2
<b>Mean</b>	<b>29.79</b>	<b>14.28333333</b>
<b>Standard deviation</b>	<b>2.944448</b>	<b>0.16733200</b>
Observations	3	3
Hypothesized Mean Difference	0	
Df	2	
t Stat	9.106857581	
<b>P(T&lt;=t) one-tail</b>	<b>0.005921934</b>	
t Critical one-tail	2.91998558	
P(T<=t) two-tail	0.011843868	
t Critical two-tail	4.30265273	

**Interpretação dos resultados:** Há diferenças significativas nos diâmetros dos halos de inibição entre os extractos preparados com metanol e n-hexano de macroalga *Caulerpa racemosa* macerados por 48 horas,  $P_{0,0059} < 0,05$ , deste modo, rejeita-se a hipótese nula.

***Avaliação da Actividade Antimicrobiana de diferentes Extractos de Macroalgas Sargassum ilicifolium e Caulerpa racemosa Colectadas na Ilha de Inhaca, Província de Maputo***

---

**Anexo. 15:** Comparação da actividade antimicrobiana de extractos de macroalga *Sargassum ilicifolium* preparados com dois solventes diferentes (Metanol e n-hexano) e macerado por 48 h frente a bactéria *Pseudomonas aeruginosa*.

Valores de halos de inibição (mm)		
Tipo de solvente		
Réplicas	Extracto metanólico de <i>S. ilicifolium</i> macerado por 48 h	Extracto hexanólico de <i>S. ilicifolium</i> macerado por 48 h
	28.29	18.63
	28.59	18.63
	27.49	15.5

*t-Test:* Two-Sample Assuming Unequal Variances

---

	Variable 1	Variable 2
<b>Mean</b>	<b>28.12333333</b>	<b>17.58667</b>
<b>Standard deviation</b>	<b>0.568621</b>	<b>1.807022</b>
Observations	3	3
Hypothesized Mean Difference	0	
Df	2	
t Stat	9.633390297	
<b>P(T&lt;=t) one-tail</b>	<b>0.005302253</b>	
t Critical one-tail	2.91998558	
P(T<=t) two-tail	0.010604505	
t Critical two-tail	4.30265273	

---

**Interpretação dos resultados:** Há diferenças significativas nos diâmetros dos halos de inibição entre os extractos preparados com metanol e n-hexano de macroalga *Sargassum ilicifolium* macerados por 48 horas,  $P_{0,0053} < 0,05$ , deste modo, rejeita-se a hipótese nula.

***Avaliação da Actividade Antimicrobiana de diferentes Extractos de Macroalgas Sargassum ilicifolium e Caulerpa racemosa Colectadas na Ilha de Inhaca, Província de Maputo***

---

**Anexo 16:** Comparação da actividade antimicrobiana de extractos metanólicos de macroalga *Caulerpa racemosa* macerados em dois tempos distintos (24 e 48 horas) frente ao fungo *Candida albicans*.

Valores de halos de inibição (mm)		
Tipo de solvente		
Réplica	Extracto metanólico de <i>C. racemosa</i> macerado por 24 h	Extracto metanólico de <i>C. racemosa</i> macerado por 48 h
1	9.3	0
2	8.7	0
3	7.6	0

*t*-Test: Two-Sample Assuming Unequal Variances

	Variable 1	Variable 2
<b>Mean</b>	<b>8.533333333</b>	<b>0</b>
<b>Standard deviation</b>	<b>0.8621484</b>	<b>0</b>
Observations	3	3
Hypothesized Mean Difference	0	
Df	2	
t Stat	17.14302797	
<b>P(T&lt;=t) one-tail</b>	<b>0.00169272</b>	
t Critical one-tail	2.91998558	
P(T<=t) two-tail	0.00338544	
t Critical two-tail	4.30265273	

**Interpretação dos resultados:** Há diferenças significativas nos diâmetros dos halos de inibição entre os extractos preparados com metanol de macroalga *Caulerpa racemosa* macerados por 24 e 48 horas,  $P_{0,0016} < 0,05$ , deste modo, rejeita-se a hipótese nula.

***Avaliação da Actividade Antimicrobiana de diferentes Extractos de Macroalgas Sargassum ilicifolium e Caulerpa racemosa Colectadas na Ilha de Inhaca, Província de Maputo***

---

**Anexo 17:** Comparação da actividade antimicrobiana de extractos de macroalga *Sargassum ilicifolium* preparados com dois solventes diferentes (Metanol e n-hexano) e macerado por 48 h frente ao fungo *Candida albicans*.

Valores de halos de inibição (mm)		
Tipo de solvente		
Réplica	Extracto hexanólico de <i>S. ilicifolium</i> macerado por 48 h	Extracto metanólico de <i>S. ilicifolium</i> macerado por 48 h
	9.3	0
	6.7	0
	7.4	0

*t*-Test: Two-Sample Assuming Unequal Variances

	Variable 1	Variable 2
<b>Mean</b>	<b>7.8</b>	<b>0</b>
<b>Standard deviation</b>	<b>1.194536</b>	<b>0</b>
Observations	3	3
Hypothesized Mean Difference	0	
Df	2	
t Stat	10.04190116	
<b>P(T&lt;=t) one-tail</b>	<b>0.004885803</b>	
t Critical one-tail	2.91998558	
P(T<=t) two-tail	0.009771606	
t Critical two-tail	4.30265273	

**Interpretação dos resultados:** Há diferenças significativas nos diâmetros dos halos de inibição entre os extractos preparados com metanol e n-hexano de macroalga *Sargassum ilicifolium* macerados por 48 horas,  $P_{0,004} < 0,05$ , deste modo, rejeita-se a hipótese nula.