



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR
CURSO DE BIOTECNOLOGIA**

GABRIELA FALCÃO DA SILVA

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIMICROBIANO E CITOTÓXICO DO
EXTRATO AQUOSO DA ESPONJA MARINHA *Aplysina lactuca***

**FORTALEZA
2025**

GABRIELA FALCÃO DA SILVA

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIMICROBIANO E CITOTÓXICO DO EXTRATO
AQUOSO DA ESPONJA MARINHA *Aplysina lactuca*

Trabalho de conclusão de curso
apresentado ao Departamento de
Bioquímica e Biologia Molecular do Centro
de Ciências da Universidade Federal do
Ceará, como requisito parcial à obtenção do
título de Bacharel em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Rômulo Farias
Carneiro.

Fortaleza
2025

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Sistema de Bibliotecas

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

S58a Silva, Gabriela Falcão da.

Avaliação do potencial antimicrobiano e citotóxico do extrato aquoso da esponja marinha *Aplysina lactuca* / Gabriela Falcão da Silva. – 2025.

37 f. : il. color.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Curso de Biotecnologia, Fortaleza, 2025.

Orientação: Prof. Dr. Rômulo Farias Carneiro.

1. Esponja marinha. 2. Atividade antibacteriana. 3. Citotoxicidade. I. Título.

CDD 661

GABRIELA FALCÃO DA SILVA

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIMICROBIANO E CITOTÓXICO DO EXTRATO
AQUOSO DA ESPONJA MARINHA *Aplysina lactuca*

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular do Centro de Ciências da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Rômulo Farias Carneiro.

Aprovada em: 18/07/2025.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Rômulo Farias Carneiro (Orientador)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Msc. Vinícius Paulino Pinto Menezes
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dra. Marjory Lima Holanda Araújo
Universidade Federal do Ceará (UFC)

AGRADECIMENTOS

À Deus, em primeiro lugar, por iluminar meu caminho e me sustentar com fé, me renovar em meio às dificuldades e me conceder forças para seguir até o fim.

À minha mãe, Elisa, meu maior exemplo e inspiração. Sempre me guiando com muito amor pelos melhores caminhos. Foi em seus conselhos, gestos e cuidados que encontrei a coragem para seguir meus sonhos. Minha gratidão é imensa e eterna.

À minha família, principalmente, aos meus avós Gabriel e Socorro, e minha tia Ângela, cuja dedicação na minha criação foi a base para construir tudo o que sou e o que venho me tornando. Por cada gesto de carinho e cuidado, o meu mais sincero obrigado.

Ao meu companheiro de vida, Daniel, pelo amor e apoio nos dias mais desafiadores desta jornada. Gratidão por cada passo dado ao meu lado e pelos que virão.

Aos meus orientadores, Rômulo Farias e Renata Pinheiro, pela confiança, apoio, paciência e incentivo constante. Ter vivido essa experiência acadêmica sob a orientação de vocês foi um privilégio que levarei comigo.

Ao Vinícius e Marjory, pela generosidade em aceitarem compor a banca. A presença de vocês nesta etapa final representa muito para mim. Muito obrigada.

Aos amigos que a graduação me deu, Clarissa, Caio, Lewi, Jamile e Letícia, por tornarem os dias exaustivos mais leves com risos, cafés e muito companheirismo. Obrigada por estarmos juntos nas dificuldades e nas conquistas. A amizade de vocês foi e sempre será essencial para mim.

Aos amigos e colegas de bancada do BIOMAR, Jessica, Vinícius, Aldeni, Philippe, Renato, Andressa, Pedro Arthur, Nicole, Marcelo, Juliana, Marília, Glória e Ellen, a jornada se tornou mais leve graças a cada um de vocês. Obrigada por cada conselho, ajuda e motivação. Serei eternamente grata.

“Tenho a impressão de ter sido uma criança brincando à beira-mar, divertindo-me em descobrir uma pedrinha mais lisa ou uma concha mais bonita que as outras, enquanto o imenso oceano da verdade continua misterioso diante de meus olhos” (Isaac Newton).

RESUMO

A biodiversidade marinha abriga organismos adaptados a condições extremas, capazes de produzir compostos bioativos com estruturas químicas únicas. As esponjas marinhas, que fazem parte do filo Porífera, se destacam por sintetizarem metabólitos com propriedades antibacterianas, antivirais, antifúngicas e antitumorais, como resposta ao estresse de seu estilo de vida séssil e filtrador. Considerando a crescente ameaça da resistência antimicrobiana, que compromete a eficácia dos tratamentos convencionais, torna-se urgente a busca por novos compostos bioativos. Nesse cenário, os ecossistemas marinhos surgem como fontes promissoras para o desenvolvimento de novos fármacos. Este estudo teve como objetivo avaliar o potencial antibacteriano do extrato aquoso da esponja marinha *Aplysina lactuca* contra cepas padrões sensíveis e resistentes de *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidermidis*, bem como avaliar o potencial citotóxico do extrato frente a eritrócitos e náuplios de *Artemia* sp. A extração dos compostos foi realizada com água destilada. Em seguida, o extrato foi concentrado por meio de liofilização e então foi submetido ao teste de antibiograma em diferentes concentrações (20 a 0,625 mg.ml⁻¹), observando-se o diâmetro dos halos de inibição. O extrato também foi submetido a testes de citotoxicidade frente ao modelo de náuplios de *Artemia* sp. Além disso, a atividade hemaglutinante e hemolítica do extrato foi avaliada. O extrato da *A. lactuca* apresentou efeitos bactericidas em concentrações acima de 5mg.mL⁻¹, apresentou citotoxicidade em concentrações acima de 5 mg.mL⁻¹ em temperatura ambiente e baixa letalidade com o extrato aquecido. Além disso, observou-se atividade hemaglutinante dose-dependente e taxa hemolítica que variou de 8,7 a 22,3 %. Diante disso, esse estudo apresenta achados promissores que podem servir de base para pesquisas futuras voltadas ao isolamento dos compostos bioativos presentes nesses organismos.

Palavras-chave: Esponja marinha, Atividade antibacteriana, Citotoxicidade.

ABSTRACT

Marine biodiversity harbors organisms adapted to extreme conditions, capable of producing bioactive compounds with unique chemical structures. Marine sponges, which are part of the Porifera phylum, are known for synthesizing metabolites with antibacterial, antiviral, antifungal, and antitumor properties in response to the stress of their sessile, filter-feeding lifestyle. Considering the growing threat of antimicrobial resistance, which compromises the effectiveness of conventional treatments, the search for new bioactive compounds is urgent. In this scenario, marine ecosystems emerge as promising sources for the development of new drugs. This study aimed to evaluate the antibacterial potential of the aqueous extract of the marine sponge *Aplysina lactuca* against standard-sensitive and resistant strains of *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, and *Staphylococcus epidermidis*, as well as to evaluate the extract's cytotoxic potential against erythrocytes and nauplii of *Artemia sp.* The compounds were extracted with distilled water. The extract was then concentrated by lyophilization and subjected to antibiogram testing at different concentrations (20 to 0.625 mg.mL⁻¹), observing the diameter of the inhibition zones. The extract was also subjected to cytotoxicity tests against the *Artemia sp.* nauplii model. Furthermore, the extract's hemagglutinating and hemolytic activity were evaluated. The *A. lactuca* extract showed bactericidal effects at concentrations above 5 mg.mL⁻¹, cytotoxicity at concentrations above 5 mg.mL⁻¹ at room temperature, and low lethality with the heated extract. Furthermore, dose-dependent hemagglutinating activity and a hemolytic rate ranging from 8.7 to 22.3% were observed. Therefore, this study presents promising findings that can serve as a basis for future research aimed at isolating the bioactive compounds present in these organisms.

Keywords: Marine sponge, Antibacterial activity, Cytotoxicity.

LISTAS DE TABELA

Tabela 1 – Ensaio de antibiograma por disco-difusão dos extratos aquosos de <i>Aplysina lactuca</i> (tamanho médio dos halos de inibição, em milímetros)	23
Tabela 2 – Resultados dos testes hemaglutinação, quantificação de proteínas e hemólise dos extratos aquosos em concentrações variadas	29
Tabela 3 – Teste de letalidade em <i>Artemia</i> sp. com os extratos aquosos de <i>Aplysina lactuca</i> em temperatura ambiente.....	30
Tabela 4 – Resultados dos testes de letalidade em <i>Artemia</i> sp. com os extratos aquosos de <i>Aplysina lactuca</i> aquecidos a 100°C por 15 minutos em porcentagem.....	30

LISTAS DE FIGURAS

Figura 1 –	Representação diagramática de uma esponja simples.....	13
Figura 2 –	Esponja marinha <i>Aplysina fistularis</i>	14
Figura 3 –	Ensaio antibiograma por disco-difusão do extrato aquoso de <i>Aplysina lactuca</i> em diferentes concentrações contra as cepas de <i>Escherichia coli</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> e <i>Staphylococcus epidermidis</i>	25
Figura 4 –	Desvio padrão dos diferentes tamanhos de halos de inibição em relação às cepas de <i>Escherichia coli</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> e <i>Staphylococcus epidermidis</i>	27
Figura 5 –	Comparação de atividade hemolítica entre as diferentes concentrações do extrato com os controles positivos e negativos.....	29

LISTAS DE ABREVIATURAS E SIGLAS

EC	<i>Escherichia coli</i>
AS	<i>Staphylococcus aureus</i>
SE	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
SISBIO	Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade
SISGEN	Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
1.1	Potencial biotecnológico dos compostos de organismos marinhos	12
1.1.1	Esponjas Marinhas	13
1.1.2	<i>Aplysina lactuca</i>	15
1.2	Bactérias	16
1.2.1	<i>Escherichia coli</i>	16
1.2.2	<i>Staphylococcus aureus</i>	16
1.2.3	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	17
2	OBJETIVOS	19
2.1	Objetivo Geral	19
2.1.1	Objetivos Específicos	19
3	MATERIAIS E MÉTODOS	20
3.1	Coleta da esponja marinha	20
3.2	Extração aquosa da esponja marinha	20
3.3	Cepas bacterianas e preparação dos inóculos	20
3.4	Atividade antibacteriana por disco-difusão	21
3.5	Atividade hemaglutinante, hemolítica e quantificação de proteínas totais ...	21
3.6	Efeito citotóxico em náuplios de artêmia	22
4	RESULTADOS	23
4.1	Extrato aquoso e avaliação do potencial antibacteriano	23
4.2	Atividade hemaglutinante, hemolítica e quantificação de proteínas totais ...	27
4.3	Efeito citotóxico	29
5	CONCLUSÃO	32
6	REFERÊNCIAS	33

1 INTRODUÇÃO

1.1. Potencial biotecnológico dos compostos de organismos marinhos

Ao longo da evolução, os organismos marinhos desenvolveram vias metabólicas específicas como forma de adaptação às condições extremas desses ambientes caracterizados por elevada pressão, pouca ou nenhuma luz solar, flutuações de temperatura e elevados níveis de salinidade. Tais adversidades ambientais, levaram essas formas de vida a criar estratégias bioquímicas para garantir sua sobrevivência, como a produção de compostos com estruturas e funções que geralmente não são encontradas em organismos de ambientes terrestres (Giordano, 2020).

Diversos organismos marinhos, como algas, invertebrados, esponjas, corais e peixes, destacam-se pela capacidade de sintetizar metabólitos secundários com importantes aplicações. Essas substâncias podem ser obtidas a partir de diferentes estruturas anatômicas dos organismos, como a pele, tecidos internos, glândulas, órgãos e secreções naturais (Bălașa; Chircov; Grumezescu, 2020). Além disso, estudos envolvendo metagenômica comprovaram que seres procariotes extremófilos, comuns em regiões oceânicas, são fontes de enzimas e metabólitos funcionais, resultado da expressão de genes específicos adaptados às condições extremas desses ecossistemas. (Dalmaso; Ferreira; Vermelho, 2015).

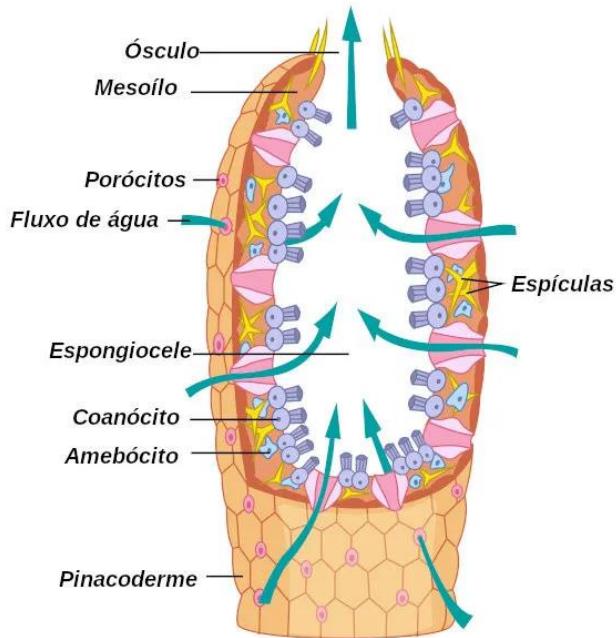
As propriedades únicas desses compostos têm atraído o interesse para aplicações terapêuticas. Entre as diversas substâncias bioativas sintetizadas por microrganismos marinhos, algumas se destacam por suas propriedades antimicrobianas, proporcionando perspectivas futuras de pesquisas voltadas para o combate de infecções bacterianas (Xu et al., 2022). Tais compostos apresentam não somente mecanismos de ação inovadores, como também estruturas químicas diferenciadas das encontradas em antibióticos convencionais. Essa singularidade estrutural contribui para uma menor chance de resistência cruzada entre os microrganismos patogênicos (Yin et al., 2019).

A imensa diversidade biológica dos ecossistemas marinhos ainda é subexplorada, embora represente uma oportunidade para a descoberta de novos compostos com potencial biotecnológico (Cheung et al., 2015). Com isso, os avanços em tecnologias de bioprospecção e exploração de novos habitats têm viabilizado o descobrimento de regiões que antes eram inacessíveis, como fontes hidrotermais profundas e áreas polares, ampliando significativamente as possibilidades de descoberta e identificação de novas moléculas bioativas para aplicações terapêuticas e biotecnológicas (Mohaned; Abdelhamid; Ali, 2021).

1.1.1 Esponjas Marinhas

As esponjas, classificadas no filo Porífera, nome derivado do latim “*porus*” (poro) e “*ferre*” (portar ou carregar), são organismos aquáticos sésseis e, diferentemente de muitos outros animais, elas não possuem órgãos, tecidos especializados, sistema nervoso ou células sensoriais. Seus corpos (Figura 1) são pouco mais que células embebidas em uma matriz gelatinosa sustentadas por espículas, que são pequenas estruturas rígidas compostas de sílica, carbonato de cálcio, ou colágeno, que conferem firmeza ao corpo da esponja. Esses animais são amplamente distribuídos em ambientes marinhos e de água doce, podendo ser encontrados desde áreas costeiras rasas, como zonas entre marés, e até em regiões oceânicas mais profundas, como as zonas abissais (Brusca; Moore; Shuster, 2019).

Figura 1 - Representação diagramática de uma esponja simples.



Fonte: Adaptado de Santos (2007)

A maioria das espécies de esponjas se encontram em ambientes bentônicos marinhos e em menor quantidade em água doce, sendo amplamente distribuídas pelos oceanos, ocupando desde áreas costeiras até regiões de grandes profundidades. Esses organismos são de significativa importância para comunidades bentônicas, contribuindo fortemente para a biodiversidade local e desempenhando papéis ecológicos essenciais, como a formação e estabilização de estruturas nos leitos oceânicos e a facilitação do fluxo de nutrientes. Além

disso, participam de interações ecológicas amplas e complexas com diversos grupos de organismos do ecossistema marinho (Yang et al., 2017; Van Soest et al., 2012).

O filo Porífera, embora apresente uma estrutura corporal relativamente simples, abriga uma impressionante diversidade morfológica e funcional, sendo a classe Demospongiae a mais representativa, reunindo cerca de 95 % de todas as espécies de esponjas conhecidas. Essa classe se caracteriza por uma grande variedade de formas, cores e tamanhos, tendo aproximadamente 11.000 espécies (Ehrlich et al., 2010; Bióicos, 2021).

Figura 2 - Esponja marinha *Aplysina lactuca*



Fonte: Adaptado de Annunziata (2019)

Por viverem fixas ao substrato, as esponjas marinhas desenvolveram respostas a essa limitação, com mecanismos de defesa química, passando a sintetizar uma gama de compostos bioativos. A defesa química das esponjas é, sobretudo, uma resposta adaptativa contra predadores, mas também auxilia com desafios diversos, tais como a competição por espaço e nutrientes, interações complexas com organismos simbiontes, infecções causadas por microrganismos patogênicos e até a exposição à radiação ultravioleta em ambientes mais rasos. (Esposito et al., 2022; Lu et al., 2021).

Dentre os compostos de organismos marinhos descobertos, as substâncias bioativas provenientes de esponjas compõem cerca de 19 % (Mehbub et al., 2024), entre elas incluem-se metabólitos secundários com diversas propriedades farmacológicas, tais como alcaloides, terpenoides, policetídeos, peptídeos não ribossômicos e glicosídeos. (Papon et al., 2022).

Devido a capacidade de produzir metabólitos secundários com estruturas químicas diversas e específicas, as esponjas têm se tornado um interessante potencial de obtenção de novas moléculas com aplicações farmacológicas e biotecnológicas (Pechenik, 2016; Varijakzahan et al., 2021)

Diversos compostos bioativos foram isolados de várias espécies de esponjas marinhas e já demonstraram eficácia em testes clínicos. Atualmente quatorze medicamentos derivados de organismos marinhos estão clinicamente aprovados por várias organizações de saúde como potenciais agentes antibacterianos, antifúngicos, antivirais, antitumorais, antimaláricos, imunossupressores e até com aplicações cardiovasculares. Dentre estes, 3 são derivados de metabólitos de esponja, como *Cytarabine*, *Vidarabine* e *Eribulin*, evidenciando o papel das biomoléculas de esponjas como fontes promissoras de terapias farmacológicas (Hassan; Shaikh 2017; Dyshlovoy; Honecker, 2020; Aguiar et al., 2021).

1.1.2 *Aplysina lactuca*

A espécie *Aplysina lactuca* (Pinheiro, Hajdu e Custódio, 2007) pertence à Classe Demospongeae, sendo classificada na Subclasse Verongimorpha, Ordem Verongiida, e incluída na Família Aplysinidae, dentro do Gênero *Aplysina*. Ela se caracteriza como uma esponja de coloração marrom-amarelada em vida, sendo descrita em regiões litorâneas do nordeste do Brasil. Ocorrem normalmente fixas na parte superior de substratos rochosos ou sobre colônias de corais. Sua morfologia é predominantemente lamelar e facilmente reconhecível, com estruturas que lembram raízes expostas de árvores tropicais de grande porte (Carneiro et al., 2017; ICMBIO, 2021; Pinheiro et al., 2007; SIBBR, 2025).

As esponjas do gênero *Aplysina* sintetizam diversos metabólitos secundários. Dentre essas substâncias, destacam-se os compostos bromados, que estão presentes em grandes quantidades na composição do animal, com aproximadamente 13% do peso seco do organismo. Além de sua importante função defensiva e de inibição da predação, os compostos bromados apresentam também potencial para aplicações na biotecnologia, com propriedades contra o câncer, malária, fungos, bactérias, além de efeitos neuroprotetores (Kajazanjian; Farinas, 2006; Lacerda, 2015). Ademais, diversos outros compostos derivados de *Aplysina*, incluindo proteínas, já foram descritos como potenciais agentes antibiofilme contra bactérias, como *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*. (Carneiro et al., 2017).

1.2 Bactérias

1.2.1 *Escherichia coli*

A bactéria *Escherichia coli* é um bacilo ausente de esporos, com a maioria de suas cepas possuindo mobilidade por flagelos que são distribuídos ao redor do seu organismo. É classificada como Gram-negativa e se insere na família Enterobacteriaceae. É composta por uma parede celular delgada e com poucas camadas de peptidoglicanos, sendo outras cepas caracterizadas com cápsulas externas constituídas por polissacarídeos. Trata-se de um microrganismo anaeróbico facultativo, sendo capaz de se multiplicar rapidamente, com tempo de duplicação de cerca de 20 minutos, desde que em condições favoráveis (Basavaraju; Gunashree, 2022).

E. coli integra naturalmente a microbiota de diversos organismos, desempenhando funções benéficas no ambiente intestinal, contudo, algumas de suas cepas podem desenvolver propriedades patogênicas, sendo denominadas *E. coli* enterovirulentas. Essas cepas estão associadas a uma gama de infecções em humanos, sendo uma consequência da diversidade genética resultante de mutações em seu material genético (Hofling; Gonçalves, 2008). Com o seu material genômico significativamente variado, a capacidade de causar infecções pode aumentar e, por consequência, a resistência a agentes antimicrobianos também se torna uma realidade. A principal forma de contágio ocorre pela ingestão de alimentos contaminados, mal higienizados ou processados indevidamente, necessitando de medidas rigorosas de controle sanitário e segurança alimentar (Sarowska et al., 2019).

As infecções por bactéria *E. coli* são geralmente tratadas com antibióticos, como Cefepima, Cefalosporinas e Polimixina B, sendo feito com base nos padrões de sensibilidade e resistência do microrganismo a esses medicamentos, por meio do teste do antibiograma. Ademais, essa bactéria pode conter genes de resistência, exigindo que o uso de antibióticos seja cuidadosamente orientado e individualizado (Mueller; Tainter, 2025)

1.2.2 *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus faz parte da microbiota natural de diversos indivíduos e, normalmente, de forma inofensiva. Porém, apresenta uma importante recorrência em múltiplas infecções clínicas. É caracterizada como uma bactéria Gram-positiva e anaeróbica facultativa que se desenvolve em temperaturas que variam entre 18 °C e 40 °C. Estruturalmente, sua parede

celular é caracterizada por uma espessa camada de peptidoglicano (Rasheed; Hussein, 2021; Braga; Cardoso, 2018).

Apesar de poder coexistir na microbiota humana sem causar complicações, *S. aureus* pode se tornar um patógeno oportunista, desencadeando infecções. Essas ocorrências variam desde condições mais simples, como infecções cutâneas, respiratórias ou gastrointestinais, até complicações mais sérias, como bactеремia e meningite (Pidwill et al., 2021).

As infecções ocasionadas por *S. aureus* estão cada vez mais desafiadoras em relação à forma de tratamento. Devido à sua alta taxa de resistência a antimicrobianos, muitas infecções se tornam alarmantes em decorrência de cepas, por exemplo, resistentes à penicilina e meticilina, que são importantes medicamentos no tratamento de infecções bacterianas. Ademais, as doenças provocadas por cepas dessa bactéria resistentes à meticilina estão associadas a maior mortalidade, aumento da morbidade e duração de tempo de hospitalização. (Guo et al., 2020).

A maioria dos patógenos bacterianos não necessitam sintetizar muitas toxinas para ocasionar infecções, mas por outro lado *S. aureus* se destaca pela grande variedade de fatores de virulência. São incluídas toxinas variadas e diversos mecanismos de alteração do seu genoma para conferir resistência a antibióticos. Os biofilmes resistentes a antibióticos por *S. aureus* são favorecidos pela presença de uma cápsula composta por polissacarídeos, o que contribui significativamente para o aumento da virulência do microrganismo, facilitando a adesão e colonização do hospedeiro durante o desenvolvimento da infecção e dificultando as estratégias de controle das infecções por ela causadas (Cheung et al., 2021; Mcguinness et al., 2017).

O tratamento para infecções ocasionadas por *S. aureus* é feito por meio dos antibióticos apropriados por meio do teste do antibiograma, tendo como resultados mais satisfatórios os antibióticos derivados da penicilina, como a Oxacilina, Cefazolina e Cefalotina (Ibrahim, 2020).

1.2.3 *Staphylococcus epidermidis*

S. epidermidis se caracteriza como uma bactéria Gram-positiva, tendo em sua morfologia cocos agrupados, sendo uma coagulase-negativa (França et al., 2021). Ela participa da microbiota natural dos seres humanos, porém, apresenta comportamento patogênico em diversos contextos, variando conforme a cepa, dada sua característica marcante de diversidade genética (Severn; Horswill, 2023). Essa bactéria é considerada o principal agente causador de infecções relacionadas a dispositivos implantáveis, sendo amplamente conhecido por sua

capacidade oportunista de formar biofilmes, dificultando o controle de sua propagação. Com isso, eleva-se o número de variantes resistentes, como a do tipo de sequência 2 (ST2), que estão normalmente relacionadas a infecções hospitalares (Lee; Anjum, 2025).

As infecções ocasionadas por *Staphylococcus epidermidis* geralmente envolvem a possibilidade de resistência à meticilina, diante disso, a utilização da vancomicina por via intravenosa é recomendada. Caso o microrganismo se mostre sensível à meticilina, o tratamento tem a possibilidade de incluir antibióticos beta-lactâmicos, como a nafcilina ou a oxacilina (Lee; Anjum, 2025).

A grande resistência bacteriana aos antibióticos atuais é causada por cepas que não respondem aos antibióticos convencionais e isso está se tornando uma problemática emergente. A principal causa desse preocupante cenário tem sido o uso pouco moderado e sem orientação profissional desses antibióticos, que torna a infecção mais prolongada e descontrolada (Tavares et al., 2020). Ademais, a formação de biofilme é um dos fatores que garantem a sobrevivência dessas espécies coagulase-negativas em condições ambientais adversas. Com isso, ocorre uma necessidade de pesquisa e composição de novos compostos antimicrobianos na indústria farmacêutica, sendo poderosos componentes antibacterianos os naturais, por apresentarem menor impacto ambiental e maior segurança (Lee; Anjum, 2025).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

- Avaliar o efeito do extrato aquoso da esponja marinha *Aplysina lactuca* contra bactérias patogênicas, bem como avaliar a citotoxicidade do extrato frente a náuplios de artêmia e eritrócitos de coelho.

2.2 Objetivos Específicos

- Preparar e concentrar extratos aquosos a partir da esponja marinha *Aplysina lactuca*;
- Investigar a atividade antibacteriana do extrato por meio do método de disco-difusão contra cepas padrão sensíveis e resistentes de *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidermidis*;
 - via teste antibiograma;
- Avaliar a citotoxicidade do extrato frente a *Artemia* sp., em diferentes concentrações e condições térmicas;
- Analisar a atividade hemaglutinante e hemolítica do extrato em eritrócitos de coelho, além da quantificação de proteínas solúveis totais.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Coleta da esponja marinha

A esponja *Aplysina lactuca* foi coletada por meio de mergulho autônomo com cilindro no Parque Estadual da Pedra da Risca do Meio, em Fortaleza, Ceará, a 18 m de profundidade. A coleta foi autorizada e certificada pela instituição ambiental responsável SISBIO (Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade, ID: 33913-13). A utilização do material genético da espécie foi autorizada e registrada no SISGEN (Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado), com o número de cadastro ID: A1792FE. A esponja foi levada para o Laboratório de Biotecnologia Marinha (BioMar) no Departamento de Engenharia de Pesca da Universidade Federal do Ceará e guardada em freezer a -20 °C até o momento de sua utilização.

3.2 Extração aquosa da esponja marinha

A esponja marinha *Aplysina lactuca* foi macerada em almofariz. O material macerado foi embebido em água destilada na proporção 1:2 (m/v). A mistura foi submetida à agitação a 170 rpm por 4 horas, com o objetivo de extrair uma maior quantidade de moléculas. Após a homogeneização o conteúdo foi filtrado em malha de nylon e, posteriormente, submetido a centrifugação a 9000 g por 15 minutos a 4 °C.

O sobrenadante denominado extrato aquoso foi transferido para novos tubos e mantidos em freezer a -20°C até uso posterior nos testes de antibiograma. Uma amostra de 160 ml foi separada para processo de liofilização.

O material seco liofilizado foi solubilizado em água destilada até atingir a concentração de 20, 10 ,5, 2,50, 1,250, 0,625 mg. mL⁻¹, para utilização nos testes antibacterianos, com o objetivo de comparar os efeitos do aumento da concentração em relação ao tamanho dos halos de inibição.

Além disso, foi feito um teste com as diferentes concentrações do extrato previamente aquecidas a 100 °C por 15 minutos para o teste de termoestabilidade dos componentes do extrato.

3.3 Cepas bacterianas e preparação dos inóculos

As cepas padrões usadas para os testes foram *Escherichia coli* ATCC 11303 e ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, ATCC 700698 e JKD6008, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 35984 e ATCC 12228, que foram obtidas junto as culturas microbianas do

Laboratório de Microbiologia Aplicada do Laboratório Integrado de Biomoléculas (LIBS), no Departamento de Engenharia de Pesca, da Universidade Federal do Ceará.

Os inóculos bacterianos de cada cepa foram preparados a partir das colônias de culturas bacterianas armazenados em placas de ágar sob refrigeração a -20 °C. Foram retiradas 5 colônias isoladas e inoculadas em 5 mL de Caldo Triptona de Soja (TSB) e incubadas por 18 horas a uma temperatura média de 37 °C.

3.4 Atividade antibacteriana por disco-difusão

As bactérias ativadas foram centrifugadas a 6000 g por 5 min a 4°C e o pellet suspenso em 5 ml de meio TSB e posteriormente agitado no vórtex. A medida de absorbância foi realizada em espectrofotômetro em comprimento de onda de 620 nm para o ajuste da concentração bacteriana a 2×10^8 UFC.mL⁻¹, em relação às curvas de calibração para cada cepa bacteriana.

Após o ajuste de concentração foram aplicados 100 µL das bactérias em placas de Petri com meio Agar Triptona de Soja (TSA) com o uso das alças de Drigalski pelo método de espalhamento/spread-plate. Os discos estéreis foram dispostos em placas para o teste de sensibilidade, e 10 µL das amostras do extrato aquoso foram adicionados em cada disco em concentrações de 20, 10 e 5 mg. mL⁻¹ em temperatura ambiente e aquecidas previamente. Uma alíquota de cada extrato foi incubada a 100 °C por 15 minutos e então submetida ao ensaio como descrito acima. O ensaio foi realizado em triplicata.

Para o controle negativo foram utilizados 10 µL de água destilada e para o controle positivo foram utilizados 5 µL do antibiótico ampicilina, com concentração de 50 µg/mL.

As placas com os discos foram incubadas em estufa a 37°C por 20 h para a posterior avaliação do diâmetro dos halos de inibição utilizando uma régua milimetrada.

3.5 Atividade hemaglutinante, hemolítica e quantificação de proteínas totais solúveis

Para os testes de atividade hemaglutinante foram utilizados eritrócitos de coelhos provenientes do Setor de Cunicultura do Departamento de Zootecnia da Universidade Federal do Ceará. As coletas foram autorizadas pelos órgãos competentes (CEUAP nº 2211202101). O sangue foi previamente lavado em solução salina (NaCl 150 mM), na proporção de 1:10, por meio de centrifugação a 1500 rpm e descarte do sobrenadante. Em seguida, a suspensão foi preparada a 3% (v/v) dos eritrócitos em NaCl 0,15M. Os testes foram realizados em placas de microtitulação de fundo “V”, conforme o protocolo estabelecido por Sampaio e colaboradores

(1998). Em cada poço foram adicionados 50 µL da solução salina (NaCl 150 mM), 50 µL da amostra serialmente diluída e 50 µL da suspensão de eritrócitos. A visualização da aglutinação foi realizada macroscopicamente após 1 hora. A atividade foi expressa em títulos de aglutinação (U.H.mL⁻¹), no qual a unidade de hemaglutinação foi definida como o inverso da última diluição capaz de causar hemaglutinação.

Para o teste de hemólise, também foi utilizando a suspensão de eritrócitos a 3%, com alterações apenas nos volumes utilizados. O ensaio de atividade hemolítica foi realizado conforme descrito por Jiang et al (2022) com modificações. Em tubos tipo Eppendorf, montados em duplicata, foram adicionados 100 µL de NaCl 0,15M, 100 µL da amostra do extrato bruto e liofilizado em diluições seriadas nas concentrações de 20 e 10 mg.ml⁻¹ e 100 µL da suspensão de eritrócitos. Como controle positivo de hemólise, utilizou-se dodecil sulfato de sódio (SDS) a 1% e como controle negativo, NaCl 0,15 M.

Após o período de incubação, os tubos foram centrifugados a 3.000 rpm por 5 min em temperatura ambiente. Foram retirados 150 µL do sobrenadante de cada tubo e transferidos para uma microplaca de 96 poços. A absorbância foi medida a 450 nm com o auxílio de um leitor de microplacas. A porcentagem de hemólise (H) foi calculada pela Equação:

$$H (\%) = \frac{(ABSAT_{450\text{ nm}} - ABSNaCl_{450\text{ nm}})}{(ABSSDS_{450\text{ nm}} - ABSNaCl_{450\text{ nm}})} \times 100 \quad \text{Eq. 1}$$

Para a determinação da concentração de proteínas solúveis totais foi utilizado o método de Bradford (1976). Para isso, utilizou-se, em duplicata, 100 µL de água destilada, 100 µL da solução aquosa de extrato liofilizado e 2,5 mL de reagente de Bradford. Após o período de 10 minutos, as leituras das absorbâncias foram medidas em espectrofotômetro com comprimento de onda de 595nm. Como controle negativo foi utilizado água destilada. Albumina Sérica Humana (HSA) foi a proteína utilizada no preparo da curva padrão.

3.6 Efeito citotóxico em náuplios de artêmia

O ensaio de citotoxicidade com náuplios de *Artemia* sp. foi realizado conforme protocolo descrito por Araújo et al. (2010), amplamente utilizado para avaliação preliminar de atividades farmacológicas e toxicológicas de extratos naturais. Inicialmente, foi preparada uma solução salina com densidade equivalente à água do mar, com concentração de 35 g/L, adicionada a um recipiente cilíndrico-cônico e submetido à aeração contínua por 30 minutos utilizando uma bomba de aquário. Após esse período, foram adicionados cistos da artêmia na

proporção de 0,1 g para cada 500ml de solução salina diluída em água destilada. A incubação foi conduzida sob iluminação constante por 36 horas, com aeração contínua, favorecendo a eclosão e o desenvolvimento dos náuplios.

Após a eclosão, os náuplios viáveis foram distribuídos em placas de 24 poços (LinbroW, Hampton Research, EUA), com 10 náuplios por poço, para a realização dos testes de exposição ao extrato da esponja *Aplysina lactuca*. O ensaio foi conduzido em triplicata, com volume final de 1 ml por poço. As concentrações testadas do extrato variam de 20 a 0,625 mg.ml⁻¹ em temperatura ambiente (25°C). Para o teste com o extrato previamente aquecido (100°C por 15 minutos), foram utilizadas as concentrações de 20, 10 e 5 mg.ml⁻¹. Como controle negativo, utilizou-se apenas solução salina, também em triplicata sob as mesmas condições experimentais.

A contagem dos náuplios vivos foi realizada após 24 e 48 horas de exposição, e a taxa de mortalidade foi calculada com base na proporção de organismos mortos em relação ao total de indivíduos inicialmente dispostos por poço.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Extrato aquoso e avaliação do potencial antibacteriano

O efeito antibacteriano dos extratos aquosos da esponja marinha *A. lactuca* sobre cepas bacterianas de *E. coli*, *S. aureus* e *S. epidermidis* está mostrado na Tabela 1. Os testes foram realizados utilizando as amostras nas concentrações de 20 a 0,625 mg.mL⁻¹. As concentrações de 20, 10 e 5 mg.mL⁻¹ foram as únicas que apresentaram atividade antibacteriana.

Tabela 1 - Antibiograma por disco-difusão dos extratos aquosos de *Aplysina lactuca* (tamanho médio dos halos de inibição, em milímetros).

Amostra (mg.mL ⁻¹)	Cepas bacterianas						
	EC 11	EC 25	SA 25	SA 70	SA JKD	SE 12	SE 35
20 mg.mL ⁻¹	8,3	12,0	13,0	10,0	12,7	10,7	11,0
20 mg.mL ⁻¹ (100°C/15 min)	-	-	-	-	-	-	-
10 mg.mL ⁻¹	8,3		10,0				
5 mg.mL ⁻¹	8,0		10,0				
Canamicina	16,0	20,0	22,0	-	20,0	24,0	-
Tetraciclina	24,0	25,0	30,0	10,0	32,0	34,0	30

Água destilada

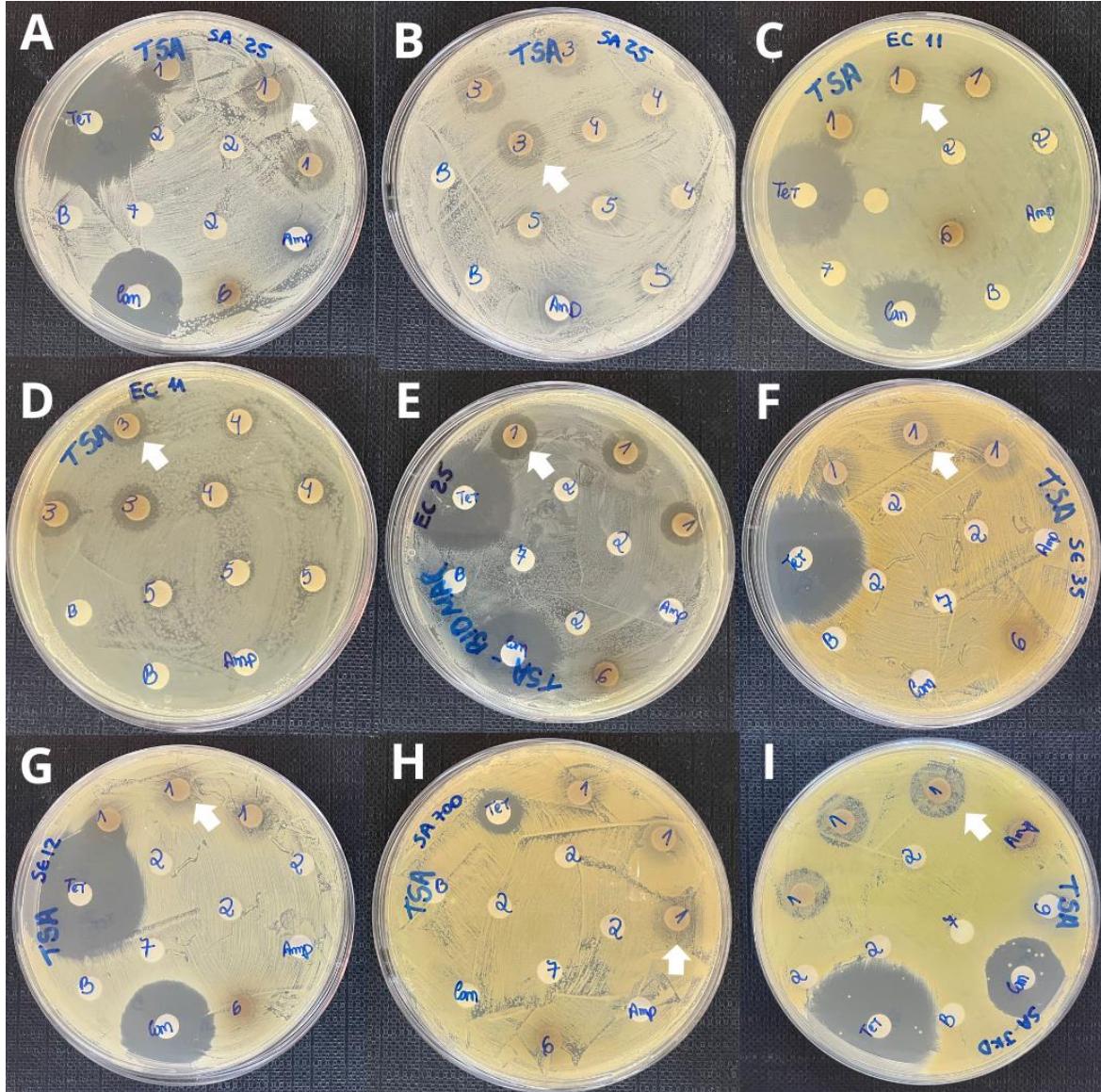
Fonte: elaborada pela autora. EC- *Escherichia coli* ATCC 11303; *Escherichia coli* ATCC 25922; AS- *Staphylococcus aureus* ATCC 25923; *Staphylococcus aureus* ATCC 700698; *Staphylococcus aureus* JKD 6008; SE- *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228; *Staphylococcus epidermidis* ATCC 35984; No disco foi utilizado 10 µL dos controles positivos (Canamicina e Tetraciclina) (50 µg), das amostras e do controle negativo (água destilada).

Os resultados da extração aquosa de *A. lactuca* mostraram atividade antibacteriana contra cepas Gram-positivas, com halos de inibição entre 10,0 mm e 13,0 mm, e contra cepas Gram-negativas, com halos entre 8,3 mm e 12,0 mm (Figura 3). Contudo, no teste de estabilidade térmica com o extrato previamente aquecido (100 °C por 15 minutos), não houve atividade antibacteriana contra as cepas. A concentração do extrato com o maior potencial antibacteriano foi a de 20mg.mL⁻¹. No entanto, a ação foi apenas inibitória e não bactericida, sendo possível visualizar o crescimento de pequenas colônias nos halos.

Esse resultado sugere a presença de compostos bioativos com atividade promissora em temperatura ambiente. Já a perda do potencial antibacteriano após o aquecimento do extrato sugere que o composto bioativo presente pode ser termossensível, o que inclui a possibilidade de ter natureza proteica, mas também envolver outras moléculas biologicamente ativas, como enzimas ou compostos bromados, que também são suscetíveis à desnaturação ou degradação térmica e podem perder sua estrutura tridimensional funcional quando aquecidas e, portanto, sua atividade biológica. Com isso, testes de quantificação foram necessários para verificar a presença de proteínas solúveis no extrato e, assim, fortalecer a hipótese de que proteínas bioativas do extrato são as responsáveis pela atividade observada.

Conforme esperado, o controle negativo (água destilada) não inibiu o crescimento bacteriano, enquanto os antibióticos apresentaram atividade contra pelo menos uma das cepas testadas. No entanto, o antibiótico Canamicina mostrou-se ineficaz frente às cepas resistentes, o que está de acordo com seu mecanismo de ação, frequentemente comprometida por mecanismos de resistência adquirida. A Tetraciclina, por outro lado, atua na inibição da síntese da parede celular, o que pode explicar sua eficácia pontual. Destaca-se ainda que, na concentração de 20 mg, o extrato testado apresentou atividade antibacteriana sobre os microrganismos, sugerindo potencial terapêutico mesmo frente a cepas com resistência antibiótica.

Figura 3 - Ensaio antibiograma por disco-difusão do extrato aquoso de *Aplysina lactuca* em diferentes concentrações contra as cepas de *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidermidis*



Fonte: elaborada pela autora. Legenda: A e B: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923; C e D: *Escherichia coli* ATCC 11303; E: *Escherichia coli* ATCC 25923; F: *Staphylococcus epidermidis* ATCC 35984; G: *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228; H: *Staphylococcus aureus* ATCC 700698; I: *Staphylococcus aureus* JKD. 1 e 3: indicando halo de inibição para concentração do extrato de 20 mg.ml⁻¹; 2: indicando não inibição do halo para concentração do extrato 20 mg.ml⁻¹ aquecida a 100°C; 4: indicando halo de inibição para concentração do extrato de 10 mg.ml⁻¹; 5: indicando halo de inibição para concentração do extrato de 5 mg.ml⁻¹; Tet e Can: indicando Tetraciclina (50 µg) e Canamicina (50 µg), respectivamente; B: indicando controle negativo.

Os métodos de extração são fundamentais para a obtenção de compostos bioativos de organismos marinhos com potencial antibacteriano, uma vez que diferentes técnicas e solventes influenciam diretamente na eficácia dos resultados. Esses métodos variam de extrações aquosas a orgânicas, com diferentes polaridades. O uso de extração aquosa no gênero *Aplysina* já havia

sido abordado por Menezes (2021), cujos extratos apresentaram halos de inibição em ensaios de disco-difusão, evidenciando atividade antibacteriana.

Entretanto, a maioria dos organismos marinhos que demonstraram atividade antibacteriana significativa foi submetida à extração com solventes orgânicos. Isso sugere que solventes possuem maior eficiência na extração de compostos antimicrobianos quando comparados à extração aquosa (Saritha et al., 2013).

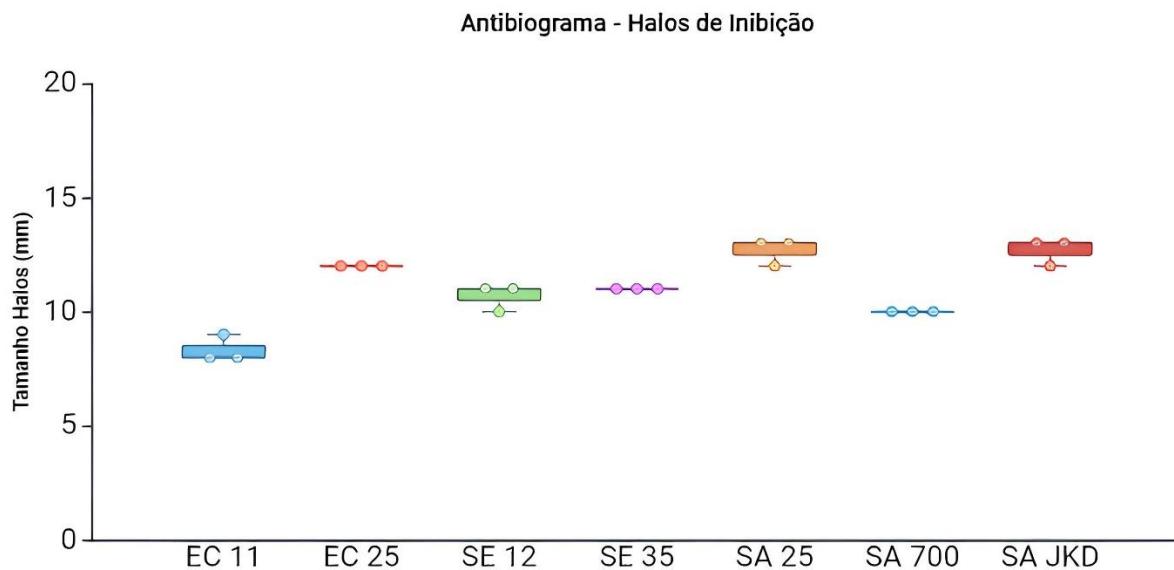
Ressaltando essa hipótese, Menezes et al. (2025) demonstraram que extratos obtidos com 50% de acetonitrila apresentaram maior eficácia contra bactérias *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* e *Escherichia coli*, quando comparados aos extratos aquosos, utilizando o método de disco-difusão. Diversas espécies de esponjas marinhas, em especial as do gênero *Aplysina*, além de outras como *Amphimedon compressa*, *Amphimedon viridis*, *Mycale* sp. e *Pseudosuberites* sp., exibiram efeitos inibitórios nesses testes.

A importância da polaridade dos solventes na extração de metabólitos secundários lipofílicos é destacada em diferentes estudos, estando associados à atividade antimicrobiana. No entanto, é importante ressaltar que, para determinados organismos, a extração aquosa pode ser mais eficiente e barata. Em alguns casos, a atividade inibitória foi observada exclusivamente nos extratos aquosos, como evidenciado por Filho (2023), em que apenas os extratos aquosos de *Pseudosuberites* sp. e *Aplysina lactuca* apresentaram halos de inibição contra três espécies bacterianas testadas.

Os extratos avaliados apresentaram eficácia inibitória contra todas as cepas testadas, sem diferenças expressivas entre bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (Figura 4), evidenciando a ampla atuação desses metabólitos. Já os resultados observados por Menezes (2025), apontaram uma menor influência inibitória dos extratos de organismos marinhos em bactérias Gram-negativas em comparação com uma maior susceptibilidade das bactérias Gram-positivas, possivelmente explicada pela estrutura de suas paredes celulares mais simples e ricas em peptidoglicano, o que facilita a entrada de compostos bioativos. Em contrapartida, a membrana externa das bactérias Gram-negativas funciona como uma barreira seletiva que dificulta a penetração dessas substâncias. (Pasquina-Lemonche et al., 2020; Li, Plésiat & Nikaido, 2015).

A ausência de diferença significativa entre os dois grupos bacterianos no presente estudo pode estar relacionada à natureza química específica dos compostos extraídos. Fatores como esse podem contribuir para superar as barreiras morfológicas típicas das bactérias Gram-negativas, ampliando o espectro de ação antibacteriana.

Figura 4 – Desvio padrão dos diferentes tamanhos de halos de inibição em relação às cepas de *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidermidis*



Fonte: elaborada pela autora em BioRender. Legenda: EC 11: *Escherichia coli* ATCC 11303; EC 25: *Escherichia coli* ATCC 25923; SE 12: *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228; SE 35: *Staphylococcus epidermidis* ATCC 35984; SA 25: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923; AS 700: *Staphylococcus aureus* ATCC 700698; SA JKD: *Staphylococcus aureus* JKD.

4.2 Atividade hemaglutinante, hemolítica e quantificação de proteínas totais solúveis

O extrato aquoso bruto e os liofilizados nas concentrações de 20, 10 e 5 mg.mL⁻¹ da esponja apresentaram atividade hemaglutinante frente a eritrócitos de coelho, comprovada pela aglutinação das células sanguíneas ao contato com o extrato. A atividade hemaglutinante do extrato variou de acordo com a concentração, atingindo 256 U.H·mL⁻¹ na concentração de 20 mg.mL⁻¹ e no extrato bruto. Já nas concentrações de 10 e 5 mg.mL⁻¹ atingiu 64 U.H.mL⁻¹ (tabela 2).

Estudos anteriores com o extrato da esponja *Aplysina cauliniformis* demonstraram um aumento significativo da atividade hemaglutinante após o tratamento dos eritrócitos de coelho e hamster com enzimas proteolíticas, indicando que essa modificação pode expor ou facilitar o acesso a sítios específicos de ligação nas membranas celulares (Miarons; Fresno, 2000). No entanto, não foi realizado nenhum pré-tratamento enzimático nos eritrócitos utilizados, e mesmo assim foi possível observar atividade hemaglutinante considerável com os eritrócitos

não tratados. Esse resultado sugere que os componentes do extrato avaliados possuem afinidade natural pelos receptores presentes na superfície eritrocitária, não necessitando de modificações prévias para exercerem sua ação.

A quantificação de proteínas revelou uma concentração no extrato bruto de 0,760 mg.mL⁻¹, 1,689 mg.mL⁻¹ no extrato de 20 mg.mL⁻¹, 0,916 mg.mL⁻¹ no extrato de 10 mg.mL⁻¹ e 0,677 mg.mL⁻¹ no extrato de 5 mg.mL⁻¹ (Tabela 2).

A avaliação da toxicidade de compostos com potencial aplicação farmacológica, incluindo sua capacidade hemolítica, é fundamental para compreender as interações entre moléculas bioativas e estruturas celulares. A atividade hemolítica é considerada um importante indicativo de citotoxicidade geral frente a células, relevante em relação a segurança do uso terapêutico de tais compostos (Ghosh et al., 2018).

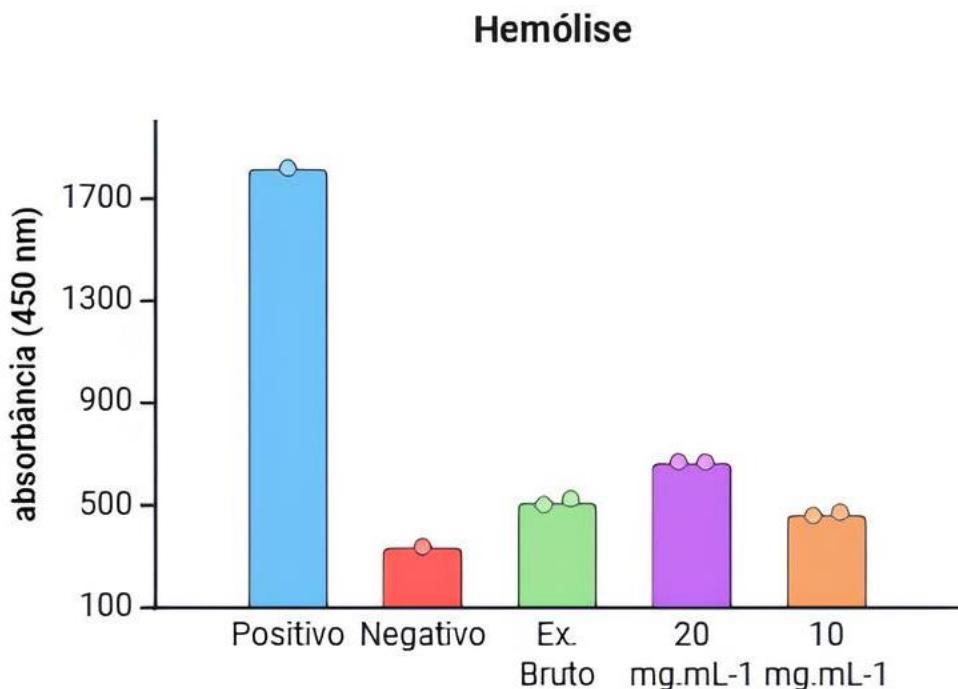
A taxa de hemólise nos extratos testados é um dado promissor, pois sugere baixa hemolítica (Figura 5), o que favorece a continuidade de estudos voltados à investigação de compostos marinhos para fins farmacológicos. De fato, diversos medicamentos amplamente utilizados na clínica demonstram taxas de hemólise de até 5% e ainda assim são considerados seguros do ponto de vista terapêutico (Jin et al., 2018).

O percentual de hemólise das soluções aquosas do extrato liofilizado de *A. lactuca* está mostrado na (Tabela 2). A absorbância do extrato bruto foi de 0,509, o que representou 11% de hemólise. A amostra de concentração de 20 mg.mL⁻¹ apresentou absorbância de 0,665, representando 22,3 % de hemólise. A amostra de 10 mg.mL⁻¹ mostrou absorbância de 0,462, com 8,69 % de hemólise. Para o controle negativo foi utilizado NaCl 0,15 M como referência de absorbância de 0,333. O controle positivo (SDS 1%) teve absorbância de 1,815.

Resultados observados por Mebs, Weiler e Heinke (1985), ao testarem frações de extratos aquosos de esponjas marinhas eluídas em colunas de Sephadex G-75, atribuíram a atividade hemolítica observada a componentes de alto peso molecular presentes nos extratos, os quais também apresentavam atividade hemaglutinante, sugerindo que essas funções podem estar associadas a proteínas como lectinas.

Esse comportamento também foi relatado por Dresch (2005), ao estudar a lectina II de esponja marinha *Axinella corrugata* (ACL-II), que demonstrou atividade hemolítica e forte capacidade de aglutinação de eritrócitos nativos de coelho. A atividade hemolítica observada em extratos de invertebrados marinhos, portanto, pode estar diretamente relacionada à presença de proteínas como lectinas ou outras moléculas bioativas, reforçando a necessidade de estudos mais aprofundados para elucidar os mecanismos moleculares envolvidos.

Figura 5 – Atividade hemolítica entre as diferentes concentrações do extrato aquoso da esponja *A. lactuca*.



Fonte: elaborada pela autora em BioRender. Legenda: Positivo: SDS 1%; Negativo: NaCl 0,15 M; Ex. Bruto: Extrato bruto. Extrato a 20 mg.mL⁻¹; Extrato a 10 mg.mL⁻¹.

Tabela 2 - Hemaglutinação, quantificação de proteínas e atividade hemolítica dos extratos aquosos da esponja *A. lactuca*.

Concentração do extrato (mg.mL ⁻¹)	Atividade Total (U.H.mL ⁻¹)	Proteína Total (mg.mL ⁻¹)	Atividade Hemolítica (%)
5,00	64	0,677	
10,00	64	0,916	8,69
20,00	256	1,689	22,3
Extrato bruto (11,00)	256	0,760	11

Fonte: elaborada pela autora. *Atividade hemaglutinante, quantificação de proteínas e atividade hemolítica.

4.3 Efeito citotóxico

O teste de citotoxicidade em náuplios de *Artemia* sp. com o extrato aquoso da *Aplysina lactuca* em temperatura ambiente indicou taxas citotóxicas acima de 10 mg.mL⁻¹ (Tabela 3).

Tabela 3 - Efeito tóxico dos extratos aquosos de *Aplysina lactuca* em *Artemia* sp.

Concentração do extrato (mg.ml⁻¹)	24 horas	48 horas
	Mortos (%)*	Mortos (%)*
20,00	100	100
10,00	97,7	100
5,00	34,4	62,2
2,50	2,2	7,7
1,25	1,2	4,5
0,625	1,2	3,4
Controle	1,2	3,4

Fonte: elaborada pela autora. *Porcentagem de náuplios de artêmias vivos ou mortos em um determinado período de tempo.

Os resultados indicam que o extrato aquoso de *A. lactuca* nas concentrações entre 0,625 mg.ml⁻¹ a 5 mg.ml⁻¹, em temperatura ambiente, não apresentaram efeito citotóxico significativo no período de 24 horas, enquanto as concentrações de 10 e 20 mg.ml⁻¹ tiveram alta taxa de letalidade. Após 48 horas, as amostras de 0,625 mg.ml⁻¹ a 2,50 mg.ml⁻¹ continuaram apresentando baixa letalidade, enquanto as de 5, 10 e 20 mg.ml⁻¹ tiveram alta taxa de mortalidade.

O ensaio de citotoxicidade utilizando náuplios de *Artemia* sp. com o extrato aquoso da *A. lactuca*, aquecido previamente a 100°C por 15 minutos, indicou baixa letalidade (Tabela 4) em comparação com as concentrações mais citotóxicas do extrato (5, 10 e 20 mg.mL⁻¹) em temperatura ambiente. Esses dados sugerem que os compostos bioativos responsáveis pela citotoxicidade são, possivelmente, de natureza proteica. Isso se deve ao fato de que, na forma nativa (sem aquecimento), o extrato promoveu alta mortalidade das artêmias, enquanto na forma desnaturada pelo calor, a letalidade foi reduzida, indicando perda da função biológica associada à desnaturação térmica das proteínas.

Tabela 4 - Efeito tóxico dos extratos aquosos de *Aplysina lactuca* aquecidos a 100°C por 15 minutos em *Artemia* sp.

Concentração do extrato (mg.ml⁻¹)	24 horas	48 horas
	Mortos (%)*	Mortos (%)*
20,00	22,3	35,6
10,00	8,9	18,9

5,00	8,9	17,8
Controle	0	2,3

Fonte: elaborada pela autora. *Porcentagem de artêmias vivas ou mortas em um determinado período de tempo.

A elevada taxa de toxicidade observada em esponjas tem sido amplamente interpretada como um mecanismo de defesa eficaz contra peixes predadores, especialmente em regiões tropicais, onde a pressão de predação é mais intensa (Rohde; Nietzer; Schupp, 2015). Diante do crescente interesse na prospecção de compostos bioativos provenientes de organismos marinhos, torna-se essencial o uso de modelos experimentais capazes de detectar preliminarmente, de forma eficiente e rápida, a toxicidade geral desses extratos biológicos. Com isso, cada vez mais tem se utilizado náuplios de artêmia como modelos experimentais para a triagem inicial de toxicidade.

Estudos, como o de Carballo (2002), reforçam a importância do uso de náuplios de artêmia na avaliação da bioatividade de extratos marinhos. Neste trabalho, foram analisados os efeitos de extratos orgânicos de 20 espécies de invertebrados marinhos por meio de dois métodos: o ensaio de letalidade com náuplios de artêmia e testes de citotoxicidade em duas linhagens celulares humanas A-549 (carcinoma de pulmão) e HT-29 (carcinoma de cólon). Os resultados demonstraram uma correlação entre a letalidade nos náuplios e a atividade citotóxica observada em células humanas, indicando que esse ensaio pode ser uma ferramenta preliminar útil para identificar compostos com potencial farmacológico e toxicológico.

5 CONCLUSÃO

As concentrações com as melhores atividades antibacterianas foram de 20 e 10 mg. mL⁻¹. O extrato obtido apresentou efeito inibitório contra cinco cepas bacterianas Gram-positivas, incluindo cepas resistentes, sugerindo a presença de compostos bioativos com potencial biotecnológico promissor. A atividade não se manteve sob altas temperaturas, evidenciando a possível natureza proteica do composto bioativo.

O extrato em temperatura ambiente apresentou efeito citotóxico nas maiores concentrações contra os náuplios de *Artêmia* sp., no entanto, com o extrato aquecido previamente, a taxa de letalidade diminuiu consideravelmente, sugerindo que o composto citotóxico possivelmente é de natureza proteica.

Com isso, mais estudos acerca dos possíveis compostos da esponja com efeito inibitório bacteriano são necessários para compreender os mecanismos envolvidos nesse potencial, para que se possa otimizar o tratamento de doenças infecciosas causadas por bactérias, utilizando compostos bioativos de fontes alternativas.

REFERÊNCIAS

- AGUIAR, A. C. C. et al. Metabolites from marine sponges and their potential to treat malarial protozoan parasites infection: A systematic review. **Marine drugs**, v. 19, n. 3, p. 134, 2021.
- AHMED, N. et al. Comprehensive exploration of marine algae diversity, bioactive compounds, health benefits, regulatory issues, and food and drug applications. **Measurement: Food**, v. 14, n. 100163, p. 100163, 2024.
- BĂLAŞA, A. F.; CHIRCOV, C.; GRUMEZESCU, A. M. Marine Biocompounds for Neuroprotection - A Review. **Marine Drugs**, v. v. 18, 2020.
- BASAVARAJU, M.; GUNASHREE, B. S. Escherichia coli: An Overview of Main Characteristics. **IntechOpen**.
- BIÓICOS, P. Poríferos: simples, mas nem tanto. projeto bioicos, 30 Jan. 2021. Disponível em: <<https://www.bioicos.org.br/post/poriferos-simples-mas-nem-tanto>>. Acesso em: 24 jun. 2025
- BONTEN, M. Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America. p. 1211–1219, 2021.
- BRADFORD, M. M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. **Analytical Biochemistry**, v. 132, 1976.
- BRAGA, R. P.; CARDOSO, T. **Psicologia e Saúde em Debate**. p. 60–60, 2018.
- BRUNE, J. E. et al. Frequency and impact on renal transplant outcomes of urinary tract infections due to extended-spectrum beta-lactamase-producing Escherichia coli and Klebsiella species. **Frontiers in medicine**, v. 11, p. 1329778, 2024.
- BRUSCA, R. C.; MOORE, W.; SHUSTER, S. M. **Invertebrados**. 2019.
- CARBALLO, J. L. et al. A comparison between two brine shrimp assays to detect in vitro cytotoxicity in marine natural products. **BMC biotechnology**, v. 2, p. 17, 2002.
- CARNEIRO, R. F. et al. Isolation, biochemical characterization and antibiofilm effect of a lectin from the marine sponge *Aplysina lactuca*. **International journal of biological macromolecules**, v. 99, p. 213–222, 2017.

CERQUEIRA, W. R. P. et al. Registro de petróleo em poríferos e cnidários durante o impacto agudo de derramamento no Nordeste brasileiro em 2019. **Scientia plena**, v. 16, n. 8, 2020.

CHEUNG, G. Y. C.; BAE, J. S.; OTTO, M. **Pathogenicity and virulence of *Staphylococcus aureus*. Virulence**, v. 12, n. 1, p. 547–569, 2021.

CHEUNG, R. C. F.; NG, T. B.; WONG, J. H. Marine peptides: **Bioactivities and applications. Marine drugs**, v. 13, n. 7, p. 4006–4043, 2015.

DALMASO, G. Z. L.; FERREIRA, D.; VERMELHO, A. B. Marine extremophiles: a source of hydrolases for biotechnological applications. **Marine drugs**, v. 13, n. 4, p. 1925–1965, 2015.

DRESCH, R. R. et al. Biological activities of ACL-I and physicochemical properties of ACL-II, lectins isolated from the marine sponge *Axinella corrugata*. Comparative biochemistry and physiology. **Part B, Biochemistry & molecular biology**, v. 161, n. 4, p. 365–370, 2012.

DYSHLOVOY, S. A.; HONECKER, F. Marine compounds and cancer: Updates 2020. **Marine drugs**, v. 18, n. 12, p. 643, 2020.

EHRLICH, H. Three-dimensional chitin-based scaffolds from Verongida sponges (Demospongiae: Porifera). Part I. Isolation and identification of chitin. **International Journal of Biological Macromolecules**, p. 132–140, 2010.

ESPOSITO, R. et al. Marine Demospongiae: A challenging treasure of bioactive compounds. **Marine drugs**, v. 20, n. 4, p. 244, 2022.

FILHO, A. M. S. Bioprospecção de extratos aquosos e orgânicos de organismos marinhos com potencial antibacteriano. 2023, 41 p. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Oceanografia), Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2023.

FRANÇA, A. et al. Virulence Factors in Coagulase-Negative Staphylococci. **Pathogens**, v. 10.

GHOSH, S.; AMARIEI, G.; MOSQUERA, M. E. G.; ROSAL, R. Polymeric ruthenium precursor as a photoactivated antimicrobial agente. **J. Hazard. Mater.** v. 402, p. 123788, 2021.

GIORDANO, D. Bioactive Molecules from Extreme Environments. **Marine drugs**, v. 18, n. 12, p. 640, 2020.

GUO, Y. et al. Prevalence and therapies of antibiotic-resistance in *Staphylococcus aureus*. Frontiers in cellular and infection microbiology. **Lausanne**, v. 10.

HASSAN, S. S. U.; SHAIKH, A. L. Marine actinobacteria as a drug treasure house. **Biomedecine & pharmacotherapie [Biomedicine & pharmacotherapy]**, v. 87, p. 46–57, 2017.

HÖFLING, J. F.; GONÇALVES, R. B. **Microscopia de luz em microbiologia: morfologia bacteriana e fúngica**. Porto Alegre, Artmed, 2008

IBRAHIM, O. *Staphylococcus aureus* a Gram-positive Coccid Bacterium Causing Microbial Infections, and Toxins Symptoms Including Food Poisoning. **EC Microbiology**, v. 16, p. 61–76, 2020.

JIANG, L. et al. Ruthenium polypyridine complexes with triphenylamine groups as antibacterial agents against *Staphylococcus aureus* with membrane-disruptive mechanism. **Front. Chem.**, v. 10, 2022.

JIN, H.; YANG, L.; AHONEN, M. J. R.; SCHOENFISCH, M. H. Nitric Oxide-Releasing Cyclodextrins. **J. Am. Chem. Soc.**, v. 140, p. 14178–14184, 2018.

KAJAZANJIAN, A.; FARIÑAS, M. Actividades biológicas del extracto acuoso de la esponja *Aplysina lacunosa* (Porifera: Aplysinidae). **Revista de biología tropical**, v. 54, p. 189–200, 2006.

LACERDA, R. B. Bromopyrrole marine alkaloids. **Revista Virtual de Química**.

LI, X.-Z.; PLÉSIAT, P.; NIKAIDO, H. The challenge of efflux-mediated antibiotic resistance in Gram-negative bacteria. **Clinical microbiology reviews**, v. 28, n. 2, p. 337–418, 2015.

LU, W.-Y. et al. Application of marine natural products in drug research. **Bioorganic & medicinal chemistry**, v. 35, n. 116058, p. 116058, 2021.

MCGUINNESS, W. A.; MALACHOWA, N.; DELEO, F. R. Vancomycin resistance in *Staphylococcus aureus*. **The Yale journal of biology and medicine**, v. 90, n. 2, p. 269–281, 2017.

MEBS, D.; WEILER, I.; HEINKE, H. F. Bioactive proteins from marine sponges: screening of sponge extracts for hemagglutinating, hemolytic, ichthyotoxic and lethal properties and isolation and characterization of hemagglutinins. **Toxicon**, v. 23, p. 955–962, 1985.

MEHBUB, M. F. et al. Marine sponge-derived natural products: trends and opportunities for the decade of 2011-2020. **Frontiers in marine science**, v. 11, 2024.

MENEZES, V. P. P. Avaliação da atividade antibacteriana em extratos aquosos e orgânicos de organismos marinhos. 2021, 42 p. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Engenharia de Pesca), Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2021.

MENEZES, V. P. P. et al. Bioprospecting of marine organisms: Exploring antibacterial activities in aqueous and organic extracts. **Microorganisms**, v. 13, n. 4, p. 940, 2025.

MIARONS, P. B.; FRESCO, M. Lectins from tropical sponges: purification and characterization of lectins from genus Aplysina. **J Biol Chem**, v. 275, p. 29283–29289, 2000.

MOHAMED, S. S.; ABDELHAMID, S. A.; ALI, R. H. Isolation and identification of marine microbial products. **Journal, genetic engineering & biotechnology**, v. 19, n. 1, p. 162, 2021.

PAPON, N.; COPP, B. R.; COURDAVAULT, V. Marine drugs: Biology, pipelines, current and future prospects for production. **Biotechnology advances**, v. 54, n. 107871.

PASQUINA-LEMONCHE, L. et al. The architecture of the Gram-positive bacterial cell wall. **Nature**, v. 582, n. 7811, p. 294–297, 2020.

PECHENIK, J. A. Biologia dos Invertebrados 7ed. **McGraw Hill Brasil**, 2016.

PECK, K. R. et al. Antimicrobials as potential adjunctive agents in the treatment of biofilm infection with *Staphylococcus epidermidis*. **Chemotherapy**, v. 49, n. 4, p. 189–193, 2003.

PIDWILL, G. R. et al. The Role of Macrophages in *Staphylococcus aureus* Infection. **Frontiers in immunology**, v. 11, 2021.

PINHEIRO, U. D. O. S. S.; HAJDU, E.; CUSTÓDIO, M. R. Aplysina Nardo (Porifera, Verongida, Aplysinidae) from the Brazilian coast with description of eight new species. **Zootaxa**, v. 1609, n. 1, p. 1–51, 2007.

RASHEED, N. A.; HUSSEIN, N. R. *Staphylococcus aureus*: An Overview of Discovery, Characteristics, Epidemiology, Virulence Factors and Antimicrobial Sensitivity. **European Journal of Molecular & Clinical Medicine**.

ROHDE, S.; NIETZER, S.; SCHUPP, P. J. Prevalence and mechanisms of dynamic chemical defenses in tropical sponges. **PloS one**, v. 10, n. 7, p. e0132236, 2015.

SAMPAIO, A. H. et al. A galactose specific lectin from the red marine algae *Ptilota filicina*. **Phytochemistry**, v. 48, p. 765–769, 1998.

SARITHA, K. et al. Antibacterial activity and biochemical constituents of seaweed *Ulva lactuca*. **Global Journal of Pharmacology**, v. 7, n. 3, p. 276-282, 2013.

SAROWSKA, J. Virulence factors, prevalence and potential transmission of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* isolated from different sources: recent reports. **Gut pathogens**.

SEVERN, M. M.; HORSWILL, A. R. *Staphylococcus epidermidis* and its dual lifestyle in skin health and infection. *Nature reviews. Microbiology*, v. 21, n. 2, p. 97–111, 2023.

SISBR. Catalogo Taxonômico da Fauna do Brasil e Lista da Flora do Brasil 2020. Disponível em: <https://ala-bie.sibbr.gov.br/ala-bie/species/196269#overview>

TAVARES, T. D. et al. Activity of specialized biomolecules against Gram-positive and Gram-negative bacteria. **Antibiotics (Basel, Switzerland)**, v. 9, n. 6, p. 314, 2020.

UGALDE, D. et al. An update on the diversity of marine sponges in the southern gulf of Mexico coral reefs. **Zootaxa**, v. 5031, n. 1, p. 1–112, 2021.

VAN SOEST, R. W. M. et al. Global diversity of sponges (Porifera). **PloS one**, v. 7, n. 4, p. e35105, 2012.

VARIJAKZHAN, D. Bioactive Compounds from Marine Sponges: Fundamentals and Applications. **Marine Drugs**, p. 27–2021, 2021.

View of Estudo fitoquímico preliminar e bioensaio toxicológico frente a larvas de Artemia salina Leach. de extrato obtido de frutos de *Solanum lycocarpum* A. St.-Hill (Solanaceae). Disponível em: <<https://rcfba.fcfar.unesp.br/index.php/ojs/article/view/403/401>>. Acesso em: 25 jun. 2025

XU, T. et al. Secondary metabolites of the genus *Nigrospora* from terrestrial and marine habitats: Chemical diversity and biological activity. **Fitoterapia**, v. 161, n. 105254, p. 105254, 2022.

YANG, Q. et al. Development of a multilocus-based approach for sponge (phylum Porifera) identification: refinement and limitations. **Scientific reports**, v. 7, n. 1, 2017.

YIN, Q. et al. Butenolide, a marine-derived broad-spectrum antibiofilm agent against both Gram-positive and Gram-negative pathogenic bacteria. **Marine biotechnology (New York, N.Y.)**, v. 21, n. 1, p. 88–98, 2019.