



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ**  
**INSTITUTO DE CIÊNCIAS DO MAR - LABOMAR**  
**DEPARTAMENTO DE OCEANOGRAFIA**  
**CURSO DE GRADUAÇÃO EM OCEANOGRAFIA**

**ALDENI MOREIRA DA SILVA FILHO**

**BIOPROSPECÇÃO DE EXTRATOS AQUOSOS E ORGÂNICOS DE ORGANISMOS**  
**MARINHOS COM POTENCIAL ANTIBACTERIANO**

**FORTALEZA**

**2023**

ALDENI MOREIRA DA SILVA FILHO

BIOPROSPECÇÃO DE EXTRATOS AQUOSOS E ORGÂNICOS DE ORGANISMOS  
MARINHOS COM POTENCIAL ANTIBACTERIANO

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao Curso de Graduação em Oceanografia do Instituto de Ciências do Mar da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Oceanografia.

Orientador: Prof. Dr. Rômulo Farias Carneiro.  
Coorientadora: Dr<sup>a</sup>. Renata Pinheiro Chaves.

FORTALEZA

2023

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)

---

- S578b Silva Filho, Aldeni Moreira da.  
Bioprospecção de extratos aquosos e orgânicos de organismos marinhos com potencial antibacteriano /  
Aldeni Moreira da Silva Filho. – 2023.  
39 f. : il. color.
- Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) – Universidade Federal do Ceará, Instituto de Ciências do  
Mar, Curso de Oceanografia, Fortaleza, 2023.  
Orientação: Prof. Dr. Rômulo Farias Carneiro.  
Coorientação: Profa. Dra. Renata Pinheiro Chaves.
1. Organismos marinhos. 2. Atividade antibacteriana. 3. Antibiograma. I. Título.
- CDD 551.46
-

ALDENI MOREIRA DA SILVA FILHO

BIOPROSPECÇÃO DE EXTRATOS AQUOSOS E ORGÂNICOS DE ORIGEM  
MARINHA COM POTENCIAL ANTIBACTERIANO

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao  
Curso de Graduação em Oceanografia do  
Instituto de Ciências do Mar da Universidade  
Federal do Ceará, como requisito parcial à  
obtenção do título de Bacharel em  
Oceanografia.

Área de concentração: Biotecnologia Marinha.

Aprovada em: \_\_\_ / \_\_\_ / \_\_\_\_.

BANCA EXAMINADORA

---

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

---

Msc. Philippe Lima Duarte  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Msc. Ellen Araújo Malveira  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

## AGRADECIMENTOS

À minha família, por me darem a oportunidade de estudar em uma escola que me preparou para seguir meu objetivo de me tornar um cientista e por me apoiarem em todas as decisões que precisei tomar durante o colegial e a graduação.

Aos meus orientadores Rômulo Farias e Renata Pinheiro, por tudo que me ensinaram pessoalmente e por todas as oportunidades que me deram para aprender ainda mais. Muito obrigado!

À Philippe e Ellen por terem aceitado fazer parte dessa banca. Obrigado!

Aos amigos que fiz durante a graduação: Laís, Marina, Wesleandro, Lúcia, Jade, Rebeca e Mariana por tornarem a passagem pela universidade uma vivência muito positiva e pelo companheirismo até o fim.

Aos amigos que fiz no laboratório: Juliana, Jéssica, Andressa, Samilly e especialmente Pedro Arthur, Vinicius, Gabriel Cândido, Philippe e Elany por todo apoio e pelos bons momentos. Muito obrigado!

Aos amigos que fiz no caminho: Kalel, Emilio, Gerlano, Italo, Pedro, Thiago, Bruno, Cléo pelo companheirismo, apoio e risadas nos bons e maus momentos durante todos esses anos.

Aos meus guias pela proteção e abertura de caminhos que sempre olharam por mim durante minhas dificuldades. Axé!

E a todos que cruzaram seus caminhos com o meu de forma que me trouxeram aprendizados durante todos esses anos.

Ori, se você estiver sendo roubado, você não se abalará; Se você estiver sendo perseguido, você não se abalará; Se você estiver sendo desrespeitado, você não se abalará; Se você estiver sendo traído, você não se abalará; Pelo bem do meu ori, todo assunto ficará doce ao final. (KINTÊ, 2023).

## RESUMO

Os organismos marinhos passaram por diversos eventos de seleção natural ao longo dos anos e desenvolveram mecanismos para perpetuar sua espécie, tanto devido ao ambiente e as condições climáticas, quanto aos seus predadores que também encontraram formas de superar as adversidades. Atualmente, os estudos com organismos marinhos vêm crescendo e mostrando o potencial dos compostos bioativos purificados, que podem fornecer moléculas capazes de tornar o tratamento de enfermidades causadas por bactérias mais efetivo contra as cepas resistentes aos fármacos comerciais. Diante disso, o estudo teve como objetivo avaliar o potencial antibacteriano dos extratos aquosos e orgânicos de organismos marinhos contra cepas padrões de *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidermidis*. Diversos organismos marinhos foram coletados em diferentes pontos do litoral do Ceará, incluindo as praias do Pacheco e Paracuru e o parque estadual marinho Pedra da Risca do Meio. Após a coleta, os extratos aquosos foram preparados com água destilada, enquanto que os extratos orgânicos com acetonitrila a 50%. Os extratos aquosos e orgânicos foram submetidos ao teste antibiograma, além disso os extratos aquosos foram também submetidos aos testes de CIM (Concentração Inibitória Mínima) e CBM (Concentração Bactericida Mínima). Dos 50 organismos marinhos coletados, extratos de 12 organismos mostraram efeito antibacteriano em extração aquosa, enquanto que extratos de 17 organismos se mostraram eficazes a partir de extração orgânica, contra pelo menos uma das espécies testadas. Em condições aquosas, a atividade antibacteriana foi predominantemente oriunda de biomoléculas de esponjas marinhas, já nos extratos orgânicos, a eficiência distribuiu-se entre moluscos, esponjas e macroalgas. Em destaque podemos citar as esponjas marinhas *Pseudosuberites* sp, *Mycale* sp, *Aplysina fistularis* e *Aplysina lactuca* para os extratos aquosos. Para os extratos orgânicos destacaram-se as esponjas marinhas *Aplysina cauliformis* e *Agelas sventres*, o equinodermo *Echinometra lucunter* e o molusco *Pugilina morio*. As esponjas marinhas *Amphimedon compressa* e *Topsentia ophiraphidites* apresentaram atividade inibitória em ambos os extratos. Das amostras coletadas, sete extratos aquosos de esponjas marinhas foram capazes de atingir efeitos bactericidas em concentrações abaixo de  $0,5 \text{ mg.mL}^{-1}$ , com destaque para *Pseudosuberites* sp., *Amphimedon compressa* e *Mycale* sp. Assim, o presente estudo mostra resultados promissores para estudos futuros, que poderão ser realizados a fim de isolar os potenciais compostos presentes nesses organismos.

**Palavras-chave:** Organismos marinhos, Atividade antibacteriana, Antibiograma.

## ABSTRACT

Marine organisms have gone through several events of natural selection over the years and have developed control to perpetuate their species, both due to the environment and climatic conditions, as well as their predators who also found ways to overcome adversity. Currently, studies with marine organisms have been growing and showing the potential of purified bioactive compounds, which can be capable of making the treatment of diseases caused by bacteria more effective against strains resistant to the antibiotics already used. Therefore, the study aimed to evaluate the antibacterial potential of aqueous and organic extracts of marine organisms against standard strains of *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*. Several marine organisms were collected at different points along the coast of Ceará, including Pacheco and Paracuru beaches and the Pedra da Risca do Meio marine state park. After collection, aqueous extracts were prepared with distilled water, while organic extracts were prepared with 50% acetonitrile. The aqueous and organic extracts were confirmed by the antibiogram test, in addition the aqueous extracts were also confirmed by the MIC (Minimum Inhibitory Concentration) and MBC (Minimum Bactericidal Concentration) tests. Of the 50 marine organisms collected, extracts of 12 organisms interacted with an antibacterial effect in aqueous extraction, while extracts of 17 organisms proved to be effective in organic extraction, against at least one of the tested species. Under aqueous conditions, there was a predominance of marine sponges, while in organic extracts, the efficiency was distributed among mollusks, sponges and macroalgae. We can mention the marine sponges *Pseudosuberites* sp, *Mycale* sp, *Aplysina fistularis* and *Aplysina lactuca* for the aqueous extracts. For organic extracts, the marine sponges *Aplysina cauliformis* and *Agelas sventres*, the echinoderm *Echinometra lucunter* and the mollusc *Pugilina morio* stood out. Marine sponges *Amphimedon compressa* and *Topsentia ophiraphidites* showed inhibitory activity in both extracts. From the collected samples, seven aqueous extracts of marine sponges were capable of achieving bactericidal effects at concentrations below 0.5 mg.mL<sup>-1</sup>, with emphasis on *Pseudosuberites* sp., *Amphimedon compressa* and *Mycale* sp. Thus, the present study shows promising results for future studies, which could be carried out in order to isolate the potential compounds present in these organisms.

**Keywords:** Marine organisms, Antibacterial activity, Antibiogram.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1** – Morfologia das bactérias. .... 15
- Figura 2** – Halos de inibição formados pelos extratos aquosos das esponjas marinhas *Amphimedon compressa*, *Aplysina fistularis*, *Aplysina lactuca* e *Pseudosuberites* sp. testados pelo método de disco-difusão contra *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidermidis*..... 28
- Figura 3** – Halos inibitórios formados pelos extratos orgânicos das esponjas marinhas *Aplysina cauliformis* e *Agelas sventres*, do equinodermo *Echinometra lucunter* e do molusco *Pugilina morio* testadas pelo método de disco-difusão contra *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidermidis*..... 30
- Figura 4** – Ensaio de Concentração Bactericida Mínima (CBM) dos extratos aquosos de esponjas marinhas *Amphimedon compressa* e *Pseudosuberites* sp. .... 34
- Figura 5** – Ensaio de Concentração Bactericida Mínima (CBM) dos extratos aquosos de esponjas marinhas *Aplysina lactuca*, *Aplysina fulva* e *Mycale* sp..... 35

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> – Organismos marinhos coletados em praias do litoral cearense e através de mergulho autônomo do Parque da Pedra da Risca do Meio.....	<b>20</b>
<b>Tabela 2</b> – Ensaio antibiograma por disco-difusão dos extratos aquosos de organismos marinhos – tamanho dos halos de inibição, em milímetros.....	<b>27</b>
<b>Tabela 3</b> – Ensaio antibiograma por disco-difusão dos extratos orgânicos de organismos marinhos – tamanho dos halos de inibição, em milímetros.....	<b>29</b>
<b>Tabela 4</b> – Ensaio de Concentração Inibitória Mínima (CIM) dos extratos aquosos de organismos marinhos.....	<b>32</b>
<b>Tabela 5</b> – Ensaio de Concentração Bactericida Mínima (CBM) dos extratos aquosos de organismos marinhos.....	<b>33</b>

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>12</b>
<b>1.1</b>	<b>Biotecnologia e suas áreas</b> .....	<b>13</b>
1.1.1	<i>Potencial bioativo dos compostos de organismos marinhos</i> .....	13
<b>1.2</b>	<b>Organismos Marinhos</b> .....	<b>14</b>
1.2.1	<i>Algas Marinhas</i> .....	15
1.2.2	<i>Invertebrados Marinhos</i> .....	15
<b>1.3</b>	<b>Bactérias</b> .....	<b>15</b>
1.3.1	<i>Escherichia coli</i> .....	16
1.3.2	<i>Staphylococcus aureus</i> .....	17
1.3.3	<i>Staphylococcus epidermidis</i> .....	17
<b>2.</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>19</b>
<b>2.1</b>	<b>Objetivo geral</b> .....	<b>19</b>
<b>2.2</b>	<b>Objetivos específicos</b> .....	<b>19</b>
<b>3.</b>	<b>METODOLOGIA</b> .....	<b>20</b>
<b>3.1</b>	<b>Coleta de organismos marinhos</b> .....	<b>20</b>
<b>3.2</b>	<b>Extração aquosa e orgânica de moléculas de organismos marinhos</b> .....	<b>22</b>
<b>3.3</b>	<b>Cepas e preparação dos inóculos</b> .....	<b>23</b>
<b>3.4</b>	<b>Atividade antibacteriana com o teste de disco-difusão</b> .....	<b>24</b>
<b>3.5</b>	<b>Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e da Concentração Bactericida Mínima (CBM)</b> .....	<b>24</b>
<b>4.</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>26</b>
<b>4.1</b>	<b>Antibiograma</b> .....	<b>26</b>
<b>4.2</b>	<b>CIM e CBM</b> .....	<b>32</b>
<b>5.</b>	<b>CONCLUSÃO</b> .....	<b>37</b>
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>38</b>

## 1 INTRODUÇÃO

O vasto ambiente marinho é conhecido pela sua imensa capacidade de armazenamento de recursos naturais que atravessam os séculos. Com o avanço da tecnologia e da ciência, os olhos dos estudiosos estão se voltando cada vez mais para os corpos d'água. Os produtos naturais têm sido sua mais promissora fonte para diversas áreas da química e da ciência de um modo geral. Usando, copiando ou modificando as moléculas sintetizadas pelos seres vivos, o homem tem obtido inovações para o seu benefício em diversas áreas (ROTTER *et al.*, 2021).

Os avanços desses estudos resultaram em um grande desenvolvimento para a indústria farmacêutica. De acordo com Mayer e colaboradores (2022), em 2018 foram descobertas atividades farmacológicas de 195 compostos marinhos que exercem funções antibacterianas, antifúngicas, antiprotozoárias, antituberculosas e antivirais. Dentre estes, 73 compostos marinhos possuem atividades antidiabéticas e anti-inflamatórias, 53 com atividade contra vírus, bactérias, fungos e protozoários, além de outros 69 que mostraram ações que poderiam ser usadas para a criação de novas classes farmacológicas.

Essa bioatividade se dá porque os organismos que ali vivem estão em constante adaptação para a sua permanência no ecossistema e assim desenvolvem diversas técnicas de proteção e autopreservação que é exigido por esse ambiente altamente competitivo em suas diferentes camadas (MOURA *et al.*, 2015).

Apesar de a comunidade científica ter consciência que o meio marinho é uma fonte de recursos potencialmente aproveitáveis pela biotecnologia, o estudo desse ambiente é limitado, já que a tecnologia necessária para a pesquisa e extração demanda grande investimento, pois as condições oxidantes, a pressão, a temperatura e outras variáveis oceânicas podem danificar os equipamentos comumente utilizados para outras atividades em meio marinho, além de dificultarem a bioprospecção e posterior estudo de perfil metabólitos e suas aplicações (CABRAL, 2020).

### 1.1 Biotecnologia e suas áreas

A biotecnologia é uma ciência multidisciplinar onde os profissionais buscam meios criativos e práticos de manipulação dos agentes biológicos para a resolução de diversos problemas nos campos de interesse da sociedade (BARCELOS *et al.*, 2018). Dentre as áreas da biotecnologia, podemos destacar o campo da biotecnologia vermelha que é dedicado à

pesquisa e aplicação nos setores da medicina, desenvolvendo novas formas de tratamento, diagnóstico e prevenção de doenças usando processos biológicos. As pesquisas dessa área envolvem a criação de órgãos artificiais, terapia e diagnóstico genético (PHAM, 2018).

Os cientistas que têm como área de atuação a biotecnologia verde buscam inovações em todas as áreas da agricultura através da manipulação genética de animais e plantas comerciais. Essas manipulações visam à criação de plantas fáceis de cultivar, resistentes a pragas e uma maior tolerância aos fatores abióticos. Em relação aos animais, os esforços são voltados para modificações no tamanho, temperamento, características físicas e resistência a doenças (BARCELOS *et al.*, 2018).

A biotecnologia branca ou biotecnologia industrial abrange áreas que vão do processamento de alimentos até o desenvolvimento e distribuição de produtos farmacêuticos, tendo em destaque a busca por biocombustíveis. Os pesquisadores desse ramo buscam formas de tornar os processos industriais mais baratos, sustentáveis e eficientes (BARCELOS *et al.*, 2018).

Por fim, temos a biotecnologia azul, onde os esforços profissionais são voltados para o meio marinho buscando novos compostos para a criação de novos produtos com usos nas indústrias alimentícia, farmacêutica, naval e agrícola ou aperfeiçoamento dos produtos já existentes (ROTTER *et al.*, 2021). Os produtos naturais derivados de organismos marinhos já são utilizados na indústria alimentícia como substitutos de conservantes químicos, na indústria naval substituindo os elementos tóxicos presentes em tintas anti-incrustantes como arsênio e mercúrio, no setor agrícola atuando principalmente no combate à pragas e no setor farmacêutico atuando como fonte de metabólitos que possuem atividade contra microorganismos patogênicos para o homem (PÉREZ; FALQUÉ; DOMÍNGUEZ, 2016).

### *1.1.1 Potencial bioativo dos compostos de organismos marinhos*

Os organismos marinhos estão inseridos em um habitat competitivo e altamente especializado e, para que esses organismos se sobressaiam na cadeia alimentar, produzem metabólitos com propriedades bioativas capazes de assegurar sua sobrevivência. Os espécimes sésseis merecem destaque, pois produzem esses metabólitos para obterem vantagem na competição por espaço, predação, epifitismo e incrustação. Alguns dos compostos produzidos por organismos sésseis possuem a capacidade de limitar o crescimento de microorganismos que causam efeitos deletérios (PÉREZ; FALQUÉ; DOMÍNGUEZ, 2016).

Dentre os compostos de maior potencial antibacteriano estão as lectinas, peptídeos, ácidos graxos, terpenos, polissacarídeos e outros (PÉREZ; FALQUÉ; DOMÍNGUEZ, 2016).

Tal capacidade antimicrobiana é de grande interesse para a indústria farmacêutica, já tendo sido relatada a existência de compostos de origem marinha com propriedades antivirais, antibacterianas, antifúngicas, anticâncer, anticoagulantes, anti-inflamatórias e etc (SHANNON; ABU-GHANNAM, 2016)

O potencial bioativo antibacteriano dos organismos marinhos pode ser a solução para o tratamento contra bactérias que são resistentes aos antibióticos já utilizados, pois, com a manipulação adequada, não só novos medicamentos podem ser criados como também os antibióticos podem atuar em conjunto para um tratamento antibacteriano eficaz (PÉREZ; FALQUÉ; DOMÍNGUEZ, 2016).

## **1.2 Organismos Marinhos**

### *1.2.1 Algas marinhas*

As algas marinhas são organismos fotossintetizantes e podem ser encontradas ao longo do litoral brasileiro sendo invisíveis a olho nu (microalgas) ou de complexidade e porte maiores (macroalgas). As macroalgas podem ser encontradas submersas ou expostas durante a maré baixa e, por apresentarem diferentes características morfológicas e reprodutivas, são divididas em três grupos: Chlorophytas (algas verdes), Rhodophytas (vermelhas) e Phaeophytas (pardas) (MARTINS *et al.*, 2018).

Esses organismos são fontes de substâncias com grande potencial biotecnológico, podendo ser utilizados para o desenvolvimento de tratamentos ou outros tipos de atividades na produção de remédios, alimentos, pigmentos, cosméticos e biocombustíveis (MARTINS *et al.*, 2018).

Atualmente, os compostos de maior interesse para extração em algas são os carboidratos, pigmentos, polifenóis, peptídeos, proteínas e ácidos graxos (KARTHIKEYAN; JOSEPH; NAIR, 2022).

### *1.2.2 Invertebrados marinhos*

O termo invertebrado é usado para definir seres multicelulares que não possuem ou não desenvolvem uma coluna vertebral derivada da notocorda. Dos 32 filos de invertebrados incorporados no ambiente marinho, 15 deles são exclusivos desse ambiente e são

principalmente encontrados nos recifes de corais e de arenito, recifes esses que abrigam uma grande diversidade de esponjas, cnidários, moluscos, crustáceos e equinodermos, além dos organismos vertebrados (MIGOTTO; MARQUES, 2003).

Os invertebrados constituem um grupo diversificado de seres com uma grande diversidade química e molecular por causa dos diferentes tipos de *habitats* em que são encontrados, tal complexidade química traduz-se em um grande potencial a ser explorado e estudado. No meio marinho, os invertebrados se desenvolveram para manter a perpetuação da espécie a ponto de serem capazes de produzir compostos tóxicos ou se associarem com organismos simbiotes (PEREZ *et al.*, 2020).

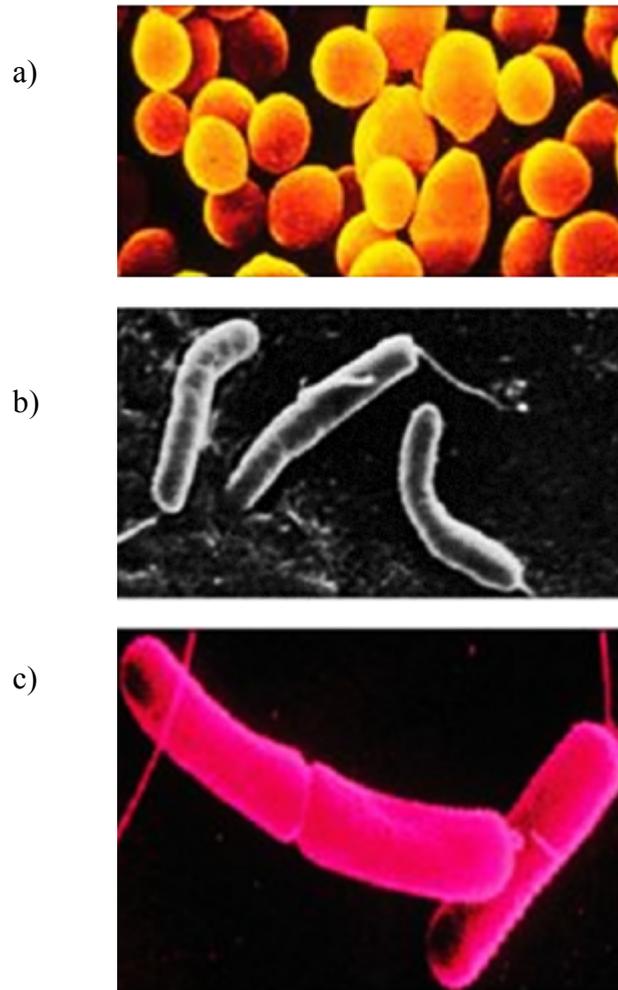
Moléculas já isoladas desses organismos, que são usadas como fonte de novos medicamentos e aplicações em tratamentos do câncer, HIV e doenças neurodegenerativas, demonstram que há um potencial crescente e expansível de aplicações biotecnológicas tendo os invertebrados marinhos como fonte primária (PEREZ *et al.*, 2020).

Moléculas isoladas de invertebrados demonstram diversos efeitos biológicos, incluindo propriedades imunomoduladoras, antifúngicas, anti-inflamatórias, anticancerígenas, antimicrobianas, neuroprotetoras, analgésicas, antimaláricas e antibacterianas (ROMANO *et al.*, 2022).

### **1.3 Bactérias**

Bactérias são organismos procariotos unicelulares que não possuem núcleo definido nem organelas membranosas e são classificadas de acordo com seu formato, sendo ele: esférico, bastão ou espiralado (Figura 1). São conhecidas por causarem uma variedade de doenças nos seres humanos e por terem seu papel como importantes decompositoras de matéria orgânica (SANTOS, 2007).

**Figura 1** – Morfologia das bactérias.



Fonte: Bacteria Identification From Microscopic Morphology: A Survey (Mohamad *et al.*, 2014). Legenda: a) Esférico; b) Espiralado; c) Bastão.

Esses organismos são importantes na ciclagem de nutrientes ao exercerem a função de fixar o nitrogênio atmosférico na forma de amônia para ser absorvido pelas plantas, além de decompor a matéria orgânica. Somado aos organismos vegetais, estes microrganismos também exercem um papel relevante na proteção e manutenção da saúde dos animais (ARAGUAIA, 2007).

Na pele, por exemplo, impedem a fixação de bactérias patogênicas. No intestino humano, podem ser encontradas bactérias envolvidas nos processos relacionados ao sistema imunológico, na produção de proteínas e vitaminas, na degradação de metabólitos e na proteção contra outras bactérias nocivas que podem causar contaminações preocupantes. Entretanto, apesar dos benefícios que possam oferecer aos seres vivos, também é possível que

estes microrganismos provoquem intoxicações ou infecções, oriundas de lesões corporais, baixa qualidade alimentar ou sistema imunológico debilitado (SANTOS, 2016).

No presente trabalho, a utilização de bactérias modelo será necessária para a observação e constatação de resultados do potencial antimicrobiano dos extratos das algas e invertebrados marinhos coletados. Para isso, uma breve introdução sobre *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidermidis* seguirá abaixo.

### 1.3.1 *Escherichia coli*

A *E. coli* é uma bactéria Gram-negativa que habita naturalmente o intestino das pessoas e de alguns animais, sem que haja qualquer sinal de enfermidade. No entanto, há alguns tipos de *E. coli* que são nocivos para as pessoas, as quais podem causar gastroenterite, disenteria intensa e infecção urinária quando entram no organismos por meio do consumo de alimentos contaminados (LEMOS, 2022).

Existem várias cepas que se tornaram altamente adaptadas e adquiriram atributos de virulência específicos, o que confere uma capacidade aumentada de adaptação a novos nichos e permite que eles causem um amplo espectro de doenças (KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004).

O tratamento para uma infecção por *E. coli* é feito de acordo com o perfil de sensibilidade dessa bactéria aos antibióticos, que é informado por meio do método do antibiograma. Os antibióticos comumente utilizados são a Ampicilina, as Cefalosporinas e o Levofloxacino (LEMOS, 2022).

### 1.3.2 *Staphylococcus aureus*

A *Staphylococcus aureus* é uma bactéria Gram-positiva que normalmente não causa infecção em peles saudáveis, mas quando consegue adentrar na corrente sanguínea se tornam responsáveis por vários tipos de infecções de risco (TAYLOR; UNAKAL; CHANDRASHEKHAR, 2017).

Esse organismo coloniza de forma não infecciosa aproximadamente 30% dos humanos nas áreas do nariz, garganta, axila, virilha e intestino. Contudo, quando infeccioso pode causar osteomielite, artrite séptica, septicemia, pneumonia e endocardite, de forma aguda ou crônica (HOWDEN, 2023).

Os sintomas mais comuns de infecção por *S. aureus* são náusea e vômito, por vezes acompanhados por disenteria e dores abdominais, além de, quando em ambiente hospitalar, são as principais causadoras de sepse. A contaminação acontece por contato direto, contato com superfícies contaminadas e autoinoculação. Seu tratamento é feito por meio dos antibióticos adequados de acordo com o teste do antibiograma, tendo como antibióticos mais usados os derivados da penicilina, como a Oxacilina, Cefazolina e Cefalotina (IBRAHIM, 2020; SCHÖFER, 2011).

### 1.3.3 *Staphylococcus epidermidis*

A *Staphylococcus epidermidis* é uma bactéria Gram-positiva que é parte da nossa microbiota normal. Esse microrganismo está presente na pele e mucosa humana, mas é mais numeroso nas superfícies úmidas como as axilas, narinas, etc. Assim, é possível classificá-lo como um patógeno oportunista, sendo uma das bactérias mais comumente associadas a infecções hospitalares (HIRAI, 2020).

Essa bactéria infecta principalmente pacientes cardíacos ou com membros protéticos, apresentando sintomas como eritemas, dor, purulência, dispneia, febre e sepse. Os antibióticos administrados para o combate às infecções por *Staphylococcus epidermidis* geralmente são a vancomicina, a oxacilina e a nafcilina (LEE, 2022).

É sabido que *S. aureus*, *S. epidermidis* e *E. coli* podem ser resistentes à penicilina G, ampicilina e amoxicilina (ELADLI *et al.*, 2019; VAN DEN HONERT; GOUWS; HOFFMAN, 2021).

Na indústria existe uma necessidade emergente de novos agentes antibacterianos e isso porque o uso excessivo de antibióticos vêm fazendo com que as bactérias criem resistência aos antibióticos comercializados e com isso dificultam o tratamento a ponto dos antibióticos comuns serem ineficazes contra as cepas resistentes. Por isso, o interesse na busca por compostos naturais com capacidade antibacteriana vêm tomando espaço nas empreitadas científicas por serem seguros e de baixo impacto ambiental para prospecção e análise. As biomoléculas resultantes desse esforço científico são de grande valor para a redução do uso de antibióticos convencionais não eficazes contra cepas resistentes e podem ser compostos fundamentais para com o objetivo de diversificar os tratamentos de infecções bacterianas e prevenção contra o surgimento de cada vez mais espécies resistentes a antibióticos (TAVARES *et al.*, 2020).

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo Geral**

Identificar e avaliar a atividade antibacteriana em extratos aquosos e orgânicos de organismos marinhos.

### **2.2 Objetivos específicos**

- Coletar organismos marinhos em alguns pontos da costa do litoral cearense;
- Preparar extratos aquosos (água destilada) e orgânicos (acetoneitrila a 50%) a partir de tecidos e fluidos de organismos marinhos;
- Avaliar a atividade antibacteriana dos extratos aquosos e orgânicos contra cepas padrões de *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidermidis* via teste antibiograma;
- Determinar a concentração inibitória mínima (CIM) e da concentração bactericida mínima (CBM) de extratos aquosos.

### 3. METODOLOGIA

#### 3.1 Coleta de organismos marinhos

Algas e invertebrados marinhos foram coletados durante o período de marés baixas nas praias do Pacheco e Paracuru localizadas no litoral do estado do Ceará. Coletas de esponjas marinhas também foram realizadas através de mergulho autônomo com cilindro no Parque da Pedra da Risca do Meio, Fortaleza - CE. Todas as coletas foram autorizadas e certificadas pela instituição ambiental responsável SISBIO (Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade, ID: 33913-11).

Os organismos foram transportados para o Laboratório de Biotecnologia Marinha (BioMar) no Departamento de Engenharia de Pesca da Universidade Federal do Ceará, onde foram mantidos em freezer a -20 °C, até o uso.

Na Tabela 1 estão listados os organismos coletados.

**Tabela 1** – Organismos marinhos coletados em praias do litoral cearense e através de mergulho autônomo do Parque da Pedra da Risca do Meio (Continua).

<b>Tipo de Organismo</b>	<b>Classe</b>	<b>Espécie</b>
<b>Cnidários</b>	<b>Anthozoa</b>	<i>Anemonia sargassensis</i>
		<i>Palythoa caribaeorum</i>
		<i>Protopalythoa variabilis</i>
		<i>Zoanthus sociatus</i>
<b>Crustáceos</b>	<b>Hydrozoa</b>	<i>Thyroscyphus ramosus</i>
	<b>Malacostraca</b>	<i>Clibanarius antillensis</i>
	<b>Thecostraca</b>	<i>Chthamalus bisinuatus</i>
<b>Echinodermata</b>	<b>Echinoidea</b>	<i>Echinometra lucunter</i>

**Tabela 1** – Organismos marinhos coletados em praias do litoral cearense e através de mergulho autônomo do Parque da Pedra da Risca do Meio (Continuação).

<b>Tipo de Organismo</b>	<b>Classe</b>	<b>Espécie</b>
<b>Esponjas Marinhas</b>	<b>Demospongiae</b>	<i>Agelas sventres</i>
		<i>Amphimedon compressa</i>
		<i>Amphimedon viridis</i>
		<i>Aplysina cauliformis</i>
		<i>Aplysina fistularis</i>
		<i>Aplysina fulva</i>
		<i>Aplysina lactuca</i>
		<i>Haliclona implexiformis</i>
		<i>Haliclona melana</i>
		<i>Ircinia felix</i>
		<i>Mycale</i> sp.
		<i>Placospongia</i> sp.
		<i>Pseudosuberites</i> sp.
		<i>Tedania ignis</i>
		<i>Tethya</i> sp.
<i>Topsentia ophiraphidites</i>		
<b>Macroalgas Marinhas</b>	<b>Rhodophyceae</b>	<i>Corallina panizzoi</i>
		<i>Corynomorpha clavata</i>
		<i>Cryptonemia crenulata</i>
		<i>Dictyurus occidentalis</i>
		<i>Galaxaura</i> sp.
		<i>Gracilaria cervicornis</i>
<i>Gracilaria</i> sp.		
<i>Laurencia</i> sp.		

**Tabela 1** – Organismos marinhos coletados em praias do litoral cearense e através de mergulho autônomo do Parque da Pedra da Risca do Meio (Final).

<b>Tipo de Organismo</b>	<b>Classe</b>	<b>Espécie</b>
<b>Macroalgas Marinhas</b>	<b>Chlorophyceae</b>	<i>Bryopsis pennata</i>
		<i>Bryopsis</i> sp.
		<i>Caulerpa mexicana</i>
		<i>Udotea flabellum</i>
	<b>Phaeophyceae</b>	<i>Spatoglossum schroederi</i>
<b>Moluscos</b>	<b>Bivalvia</b>	<i>Crassostrea</i> sp.
		<i>Pinctada imbricata</i>
	<b>Gastropoda</b>	<i>Aplysia dactylomela</i>
		<i>Fissurella</i> sp.
		<i>Leucozonia nassa</i>
		<i>Pisania pusio</i>
		<i>Pleuroploca aurantiaca</i>
		<i>Pugilina morio</i>
		<i>Stramonita brasiliensis</i>
		<i>Tegula viridula</i>
		<i>Turbinella laevigata</i>
	<i>Vitta meleagris</i>	
	<b>Polyplacophora</b>	<i>Ischnochiton pectinatus</i>

Fonte: O próprio autor.

### 3.2 Extração aquosa e orgânica de moléculas de organismos marinhos

Os extratos aquosos foram preparados a partir de talos de algas marinhas e tecidos e fluidos de invertebrados marinhos. Os organismos foram macerados em almofariz com/sem nitrogênio líquido, a depender da natureza do tecido, e o macerado foi homogeneizado em água destilada nas proporções 1:3 e 1:2 (peso/volume) para as macroalgas e invertebrados marinhos, respectivamente.

As misturas foram submetidas à agitação constante a 170 RPM durante 4 horas, filtradas em malha de nylon e centrifugadas a 9000 x g por 20 min a 4°C. Os sobrenadantes foram coletados e armazenados a -20 °C.

O extrato orgânico foi preparado de forma semelhante aos extratos aquosos, sendo utilizado acetonitrila a 50% ao invés da água destilada. Os extratos orgânicos foram submetidos à agitação constante a 170 RPM durante 4 horas e centrifugadas a 9000 x g por 20 min a 4 °C. Em seguida, foram aliqüotados 2 mL para processo de remoção da acetonitrila e concentração das amostras através de evaporação em centrífuga concentradora à vácuo (Labconco, MO, EUA) a 35 °C, por aproximadamente 2 horas. Os extratos orgânicos foram transferidos para tubos novos e armazenados em freezer a -20 °C até uso posterior.

O uso dos tecidos de organismos marinhos para exploração científica é autorizado e certificado pela instituição ambiental responsável SISGEN (Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado, ID: AC14AF9, A1792FE, A9D15EA, AC14AF9, ACC97AD).

### **3.3 Cepas e preparação dos inóculos**

As cepas utilizadas para os testes foram *Escherichia coli* ATCC 11303, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 e *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228, que pertencem à coleção de culturas microbiana do Laboratório de Microbiologia aplicada do Laboratório Integrado de Biomoléculas (LIBS) da Universidade Federal do Ceará.

Para as condições de crescimento das espécies bacterianas adotou-se a metodologia proposta pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute* - CLSI, (2015), com algumas modificações. Todo o procedimento foi realizado dentro de uma cabine bacteriológica (Airstream ESCO, PA, EUA). A partir dos estoques, onde os microrganismos ficam armazenados em uma solução de Caldo Triptona de Soja (TSB) e glicerol 20% a -80 °C, estes foram estriados em placas de Petri contendo Ágar Triptona de Soja (TSA) e incubados em estufa bacteriológica (Panasonic, OSA, JP) a 37°C por 24 horas.

Após o crescimento nas placas, 5 colônias isoladas foram removidas, inoculadas em 5 mL de meio TSB e incubadas sobre as mesmas condições por mais 24 h. Em seguida, a cultura foi transferida para tubos plásticos de 50 mL e centrifugada a 6.000 x g a 4 °C por 5 min, sendo então suspensa em novo meio TSB (10 mL). Posteriormente, com o auxílio do espectrofotômetro (Amersham Biosciences, Reino Unido), a concentração celular da

suspensão bacteriana foi ajustada a  $2 \times 10^8$  UFC.mL<sup>-1</sup>, através de turbidimetria (620 nm) e curvas de calibração previamente determinada para cada bactéria.

### **3.4 Atividade antibacteriana com o teste de disco-difusão**

O teste foi realizado seguindo os métodos recomendados pelo *National Committee for Clinical Laboratory Standards* - NCCLS, (2003) para testes de sensibilidade por disco-difusão da 8ª edição com pequenas modificações. Os inóculos ajustados para  $2 \times 10^8$  UFC.mL<sup>-1</sup> foram incorporados em placas contendo meio com ágar com auxílio da alça de Drigalski. De sete a doze discos virgens e estéreis são colocados na superfície de uma placa de ágar semeada. Então 10 µL de amostra dos extratos, previamente incubados em radiação ultravioleta (UV) por 15 minutos, foram aplicados nos discos. A água destilada utilizada na preparação dos extratos foi considerada como controle negativo e foram aplicados 10 µL nos discos. O antibiótico ampicilina foi utilizado como controle positivo na concentração de 50 µg. As placas com os discos foram incubadas em estufa a 37 °C por 18h.

As placas previamente incubadas a 37 °C foram examinadas para avaliação da formação dos halos de inibição. Os diâmetros dos halos de inibição foram mensurados usando um paquímetro ou uma régua, incluindo o diâmetro do disco. A formação de halo foi classificada como cepa sensível a um composto presente no extrato e a não formação do halo como cepa resistente.

### **3.5 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e da Concentração Bactericida Mínima (CBM)**

Os extratos com atividade antibacteriana observada em disco-difusão foram submetidos a experimentos para determinação da concentração inibitória mínima (CIM) e da concentração bactericida mínima (CBM). Novas extrações aquosas das espécies que apresentaram atividade foram realizadas e os extratos foram liofilizados. Antes da realização do CIM e CBM foi realizado o antibiograma das novas extrações para confirmar a existência da atividade antibacteriana previamente observada. O novo teste foi realizado adicionando 10 µL de amostra a 20 mg.mL<sup>-1</sup>, que equivale a 200 µg em cada disco. Em seguida, os extratos liofilizados foram suspensos em Caldo Mueller-Hinton (MHB) na concentração final de 1,0 mg.mL<sup>-1</sup> e esterilizados por filtro 0,22 µm.

A avaliação da atividade antibacteriana foi realizada segundo o ensaio de microdiluição em caldo, em placas de poliestireno de 96 poços de fundo plano de acordo com as normas sugeridas por Wayne (2015), com algumas modificações.

Para a determinação da CIM o experimento ocorreu em triplicata nas concentrações  $0,5 \text{ mg.mL}^{-1}$  a  $7,8 \text{ }\mu\text{g.mL}^{-1}$  utilizando  $100 \text{ }\mu\text{L}$  da suspensão bacteriana já previamente ajustada na concentração de  $2 \times 10^6 \text{ UFC.mL}^{-1}$  e sendo as placas incubadas em estufa bacteriológica a  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  por 24 horas. A avaliação do crescimento bacteriano foi mensurada através da turbidez dos poços com auxílio do leitor de microplacas (SpectraMax i3) com um comprimento de onda de 620 nm. Considerou-se como CIM (Concentração Inibitória Mínima) a menor concentração capaz de inibir visualmente o crescimento bacteriano. Para a determinação da CBM (Concentração Bactericida Mínima) foram removidos  $10 \text{ }\mu\text{L}$  da solução contida nos poços das placas do CIM das amostras, que não apresentaram crescimento bacteriano visualmente, seguido de inoculação em placas de Petri com Ágar Mueller-Hinton (MHA). As placas de Petri foram incubadas em estufa bacteriológica a  $37^\circ\text{C}$  por 24 horas. Após o período de 24 h foi avaliada a presença de unidades formadoras de colônias (UFC) e considerou-se como CBM, a menor concentração da substância teste que inibiu o crescimento visível das UFCs.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Antibiograma

Do total de 50 organismos marinhos coletados, 12 extratos aquosos e 17 extratos orgânicos apresentaram efeito antibacteriano contra pelo menos uma das espécies testadas.

As esponjas marinhas foram os organismos que apresentaram mais extratos com efetividade inibitória e bactericida. Em especial as espécies *Amphimedon compressa*, *Mycale* sp, *Pseudosuberites* sp. e as representantes do gênero *Aplysina*, tiveram extratos aquosos com maior halo formado.

Os extratos das esponjas marinhas *Amphimedon compressa* e *Topsentia ophiraphidites* apresentaram efeito inibitório em ambos os extratos (aquoso e orgânico). Os extratos aquosos de diversas partes do molusco *Aplysia dactylomela* apresentaram grandes halos inibitórios, contudo esse resultado já era esperado visto que esse organismo já fora estudado quanto a sua atividade antibacteriana. Melo e colaboradores (2000) isolaram uma proteína presente na glândula de tinta de *A. dactylomela*, a qual apresentou atividade hemaglutinante e antibacteriana. Além disso, já foi reportado que, das 46 espécies conhecidas do gênero *Aplysia*, a espécie *Aplysia dactylomela* é a mais comumente estudada por seus compostos naturais que, em parte, se devem à sua dieta composta principalmente por algas vermelhas do gênero *Laurencia* que as fazem acumular metabólitos halogenados derivados dessa alga que são modificados quando em seu organismo, sendo estes já conhecidos por suas capacidades antifúngicas, antibacterianas, citotóxicas e neurotóxicas (MATSUYAMA *et al.*, 2022)

Juntamente com as esponjas marinhas, as macroalgas foram os organismos que mais demonstraram potencial inibitório, mantendo o cenário de que são os organismos marinhos foco dos esforços científicos na busca por compostos bioativos com atividade antibacteriana (COSTA-LOTUFO *et al.*, 2022).

Os resultados observados dos testes antibacterianos dos extratos aquosos estão apresentados na Tabela 2.

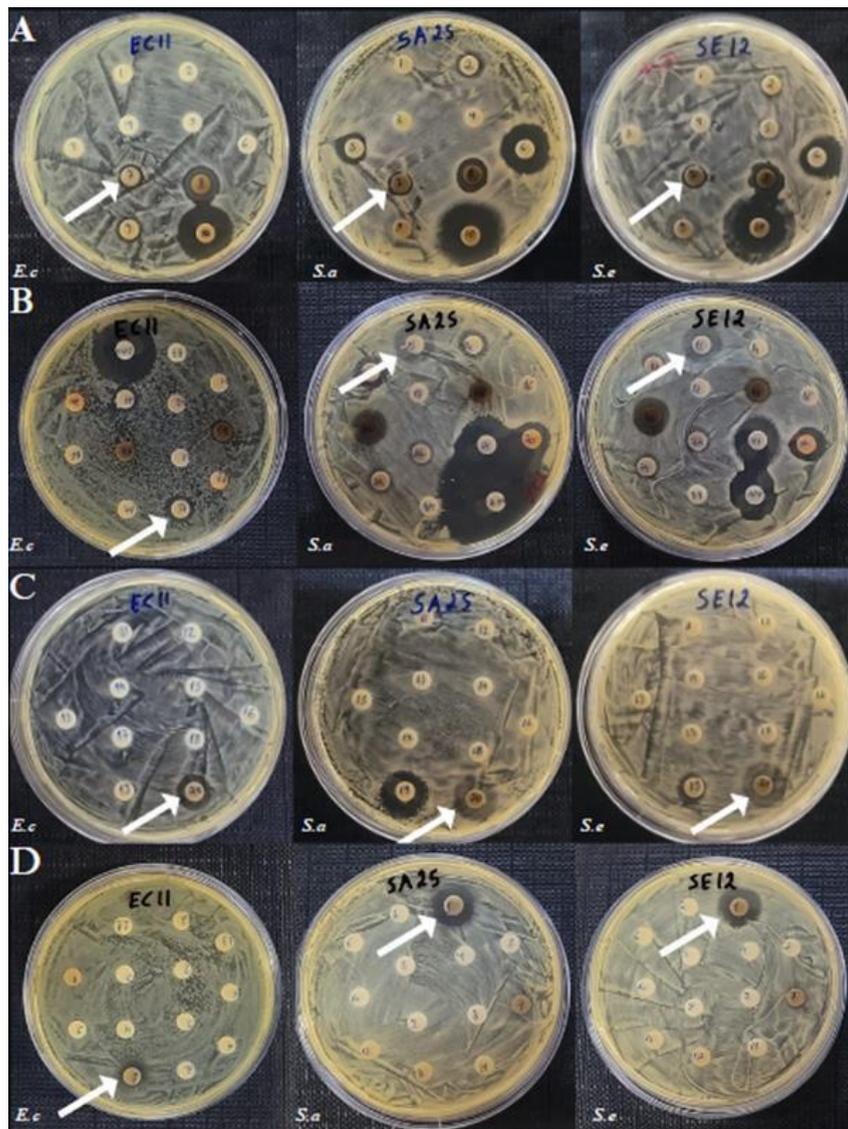
**Tabela 2** – Ensaio antibiograma por disco-difusão dos extratos aquosos de organismos marinhos – tamanho dos halos de inibição, em milímetros.

Tipo de Organismo	Amostra	Espécies bacterianas		
		<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>S. epidermidis</i>
Esponjas Marinhas	<i>A. viridis</i>	8	-	8
	<i>T. ignis</i>	-	10	8
	<i>A. compressa</i>	10	8	8
	<i>Mycale</i> sp.	-	14	10
	<i>A. fistularis</i>	10	14	14
	<i>Pseudosuberites</i> sp.	8	14	14
	<i>A. lactuca</i>	11	14	14
	<i>Ircinia felix</i>	-	-	8
	<i>Agelas sventres</i>	-	-	8
	<i>T. ophiraphidites</i>	-	20	18
Moluscos	<i>L. nassa</i>	-	-	8
	<i>Aplysia dactylomela</i> (glândula nidamental)	-	-	11
	<i>Aplysia dactylomela</i> (tinta)	12	21	14
	<i>Aplysia: Brânquias</i>	8	20	16
	<i>Aplysia: ovotestis</i>	-	18	16
	<i>Aplysia: pele</i>	-	20	16
	<i>Aplysia: glândula de tinta</i>	10	20	20
Controle Positivo	Ampicilina	15	23	13
Controle Negativo	Água destilada	-	-	-

Fonte: O próprio autor. No disco foram utilizadas 5 µL de ampicilina (33 µg.mL<sup>-1</sup>) como controle positivo e 10 µL de cada amostra e do controle negativo.

Alguns dos halos inibitórios formados por extratos aquosos de esponjas podem ser vistos na Figura 2.

**Figura 2** – Halos de inibição formados pelos extratos aquosos das esponjas marinhas *Amphimedon compressa*, *Aplysina fistularis*, *Aplysina lactuca* e *Pseudosuberites* sp. testados pelo método de disco-difusão contra *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidermidis*.



Fonte: O próprio autor. Legenda: A: *Amphimedon compressa*; B: *Aplysina fistularis*; C: *Aplysina lactuca*; D: *Pseudosuberites* sp. Um volume de 10  $\mu$ L do extrato foi aplicado nos discos estéreis. Ec – *Escherichia coli*; Sa – *S. aureus*; Se – *S. epidermidis*.

Os extratos orgânicos da esponja marinha *Aplysina cauliformis* e do molusco *Pugilina morio* apresentaram halos inibitórios para as três espécies bacterianas, enquanto que os

extratos orgânicos da esponja marinha *Topsentia ophiraphidites* e do equinodermo *Echinometra lucunter* demonstraram capacidade inibitória para as espécies Gram-positivas (Tabela 3).

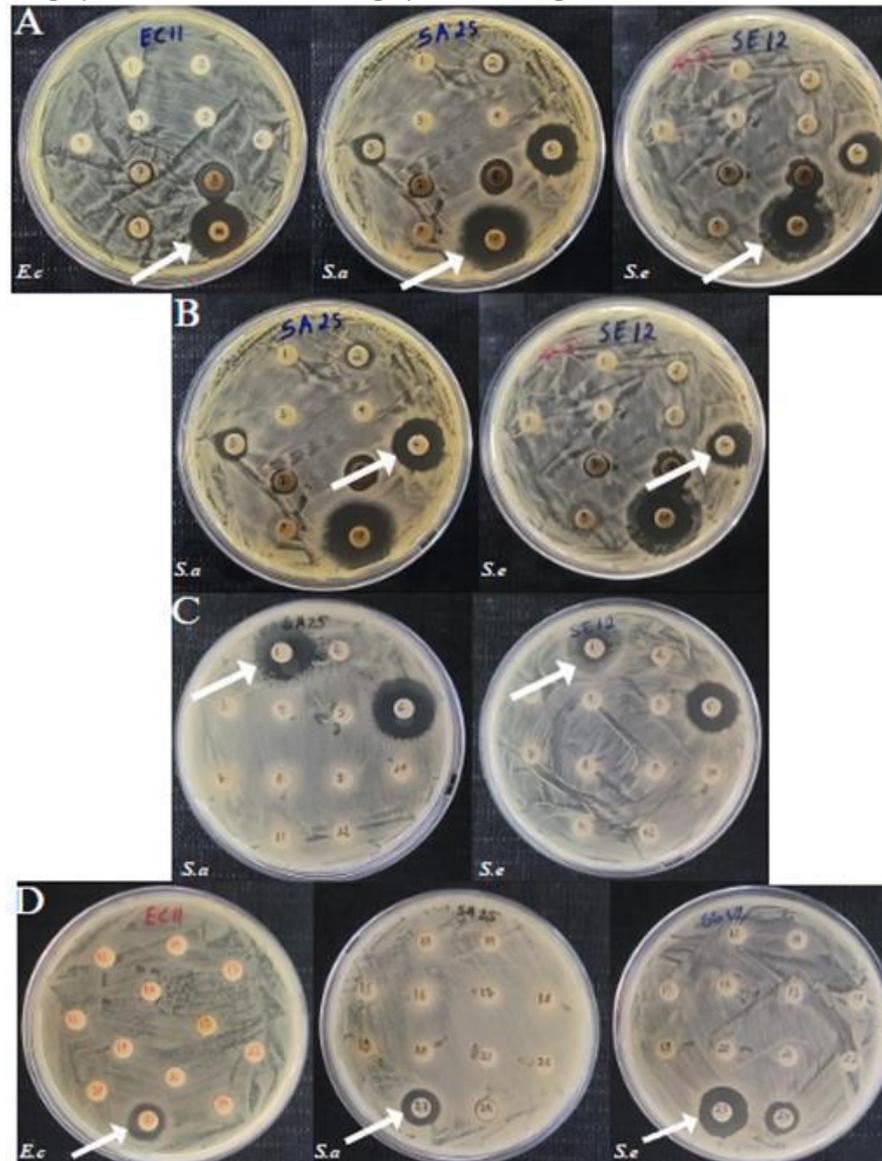
**Tabela 3** – Ensaio antibiograma por disco-difusão dos extratos orgânicos de organismos marinhos – tamanho dos halos de inibição, em milímetros.

Tipo de Organismo	Amostra	Espécies bacterianas		
		<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>S. epidermidis</i>
Esponjas Marinhas	<i>H. melana</i>	-	10	12
	<i>Agelas sventres</i>	-	16	12
	<i>A. compressa</i>	11	10	10
	<i>T. ophiraphidites</i>	-	20	18
	<i>A. viridis</i>	10	10	10
	<i>A. cauliformis</i>	19	22	24
Equinodermos	<i>Echinometra lucunter</i>	-	20	14
Cnidários	<i>Z. sociatus</i>	-	8	-
Crustáceos	<i>C. antillensis</i>	8	-	-
	<i>C. panizzoi</i>	-	10	-
Macroalgas Marinhas	<i>Laurencia</i> sp.	-	10	-
	<i>C. crenulata</i>	-	8	-
	<i>G. cervicornis</i>	-	9	-
Moluscos	<i>L. nassa</i>	-	-	10
	<i>Tegula viridula</i>	-	10	-
	<i>Pisania pusio</i>	-	9	-
	<i>Pugilina morio</i>	10	10	14
Controle Positivo	Ampicilina	15	23	13
Controle Negativo	Água destilada	-	-	-

Fonte: O próprio autor. No disco foram utilizados 5 µL de ampicilina (33 µg.mL<sup>-1</sup>) como controle positivo e 10 µL de cada amostra e do controle negativo.

Alguns dos halos inibitórios formados por extratos orgânicos de organismos marinhos podem ser vistos na Figura 3.

**Figura 3** – Halos inibitórios formados pelos extratos orgânicos das esponjas marinhas *Aplysina cauliformis* e *Agelas sventres*, do equinodermo *Echinometra lucunter* e do molusco *Pugilina morio* testadas pelo método de disco-difusão contra *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidermidis*.



Fonte: O próprio autor. Legenda: A: *Aplysina cauliformis*; B: *Agelas sventres*; C: *Echinometra lucunter*; D: *Pugilina morio*. Um volume de 10  $\mu$ L do extrato orgânico foi aplicado nos discos estéreis. Ec – *Escherichia coli*; Sa – *S. aureus*; Se – *S. epidermidis*.

Quando comparado aos resultados obtidos dos extratos aquosos é possível concluir que o solvente orgânico (acetonitrila a 50%) foi capaz de extrair uma maior variedade de moléculas com potencial antibacteriano, pois uma maior variedade de organismos apresentou efeitos inibitórios para pelo menos uma cepa. Por exemplo, o extrato orgânico da esponja *Agelas sventres* apresentou halo inibitório de 16 mm para *S. aureus* e 12 mm para *S. epidermidis*, enquanto que o extrato aquoso da mesma esponja apresentou halo inibitório de apenas 8 mm e foi capaz de inibir apenas o crescimento de *S. epidermidis*.

A maior variedade de organismos marinhos apresentando potencial inibitório foi quando os extratos foram preparados com acetonitrila e isso se deve, possivelmente, a maior eficiência dos solventes orgânicos em extrair compostos com propriedades antimicrobianas comparadas aos métodos baseados em extração aquosa (SARITHA *et al.*, 2013).

Curiosamente, para alguns organismos foi observado justamente o contrário, onde a capacidade inibitória foi presente apenas nos extratos aquosos. Por exemplo os extratos das esponjas marinhas *Pseudosuberites* sp. e *Aplysina lactuca* que apresentaram halos inibitórios para as três espécies de bactérias testadas, além do molusco *Aplysia dactylomela* que demonstrou alta capacidade de inibição bacteriana em diferentes secções de seus tecidos.

Extratos orgânicos e aquosos das esponjas do gênero *Amphimedon* apresentaram resultados inibitórios contra pelo menos uma das espécies bacterianas. De acordo com Shady e colaboradores (2018), o gênero *Amphimedon* possui diversos metabólitos secundários que apresentam atividade antibacteriana, dentre eles estão os alcalóides. Além disso, é sabido que as espécies *Amphimedon compressa* e *A. viridis* possuem atividade comprovada contra diversas espécies de bactérias (LHULLIER *et al.* 2019).

A esponja *Agelas sventres* é caracterizada por ter uma densa e diversa comunidade bacteriana e é classificada como uma esponja com alta abundância microbiana. (INDRANINGRAT *et al.*, 2019). Os estudos de Zhang e colaboradores (2017) concluíram que *A. sventres* é fonte de metabólitos secundários com atividade antimicrobiana.

Os efeitos inibitórios observados frente às espécies de *Staphylococcus* dos extratos da esponja *Topsentia ophiraphidites* reforçam sua potencialidade antimicrobiana quando correlacionados com os estudos de Kossuga e colaboradores (2007) que comprovam sua eficácia contra protozoários e fungos.

As esponjas do gênero *Aplysina* demonstraram ser uma fonte de compostos com potencial antibacteriano, uma vez que todas as espécies testadas desse gênero apresentaram algum grau de inibição, o extrato orgânico de *A. cauliformis* e o extrato aquoso de *A. lactuca* foram capazes de inibir o crescimento de todas as três espécies bacterianas testadas. De fato,

Seleguin e colaboradores (2007) evidenciaram que as esponjas da ordem *Verongida*, onde está incluído o gênero *Aplysina*, são consideradas as maiores fontes de metabólitos bromados derivados de alcalóides que são conhecidos por seus efeitos bioativos tais como, antagonistas serotoninérgicos, inibidores da atividade quinase, neuroprotetores, antimaláricos, analgésicos, anticâncer, antibacterianos, antifúngicos e anti-histamínicos (LACERDA, 2015).

Uma atividade inibitória já era esperada das esponjas marinhas do gênero *Aplysina*, *Mycale* sp., *Pseudosuberites* sp., e *Topsentia ophiraphidites*, pois Menezes (2021) também constatou que seus extratos aquosos e orgânicos apresentaram halos inibitórios quando submetidos ao ensaio antibiograma por disco-difusão.

#### 4.2 Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM)

A Concentração Inibitória Mínima (CIM) é a menor concentração que uma amostra é capaz de inibir o crescimento bacteriano. Já a Concentração Bactericida Mínima (CBM) é definida como a menor concentração de um agente antimicrobiano que consegue eliminar todas as bactérias que entram em contato (TAVARES *et al.*, 2020). Na tabela 4 estão representados os resultados observados em extratos aquosos de sete esponjas marinhas, listadas por desempenho, que foram submetidas aos ensaios CIM e CBM.

**Tabela 4** - Ensaio de Concentração Inibitória Mínima (CIM) dos extratos aquosos de organismos marinhos.

Amostras	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>S. epidermidis</i>
<i>Pseudosuberites</i> sp.	7,8	7,8	7,8
<i>Amphimedon compressa</i>	62,5	62,5	62,5
<i>Mycale</i> sp.	-	125	62,5
<i>Aplysina fulva</i>	-	250	250
<i>Topsentia ophiraphidites</i>	-	250	500
<i>Ircinia felix</i>	-	250	500
<i>Aplysina lactuca</i>	-	500	500

Fonte: O próprio autor. Concentração de 500  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  a 7,8  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  utilizando 100  $\mu\text{L}$  da suspensão bacteriana inicial de  $2 \times 10^6$  UFC.mL<sup>-1</sup>.

O extrato aquoso da esponja marinha *Pseudosuberites* sp. apresentou alta capacidade inibitória até a menor concentração testada ( $7,8 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ) para as três espécies bacterianas testadas, demonstrando que o método de extração aquosa foi eficiente em extrair uma alta quantidade de metabólitos bioativos, contudo o extrato da esponja *Amphimedon compressa* também foi capaz de expressar atividade inibitória em baixas concentrações de  $62,5 \mu\text{g.mL}^{-1}$  para as três espécies bacterianas testadas. O extrato aquoso da esponja *Mycale* sp. apresentou atividade inibitória em concentrações de  $62,5$  e  $125 \mu\text{g.mL}^{-1}$  para *S. epidermidis* e *S. aureus*, respectivamente. Os demais extratos apresentaram CIM em concentrações superiores a  $250 \mu\text{g.mL}^{-1}$  para as bactérias Gram-positivas. O extrato aquoso de *A. lactuca* apresentou atividade inibitória apenas na concentração de  $500 \mu\text{g.mL}^{-1}$  para as espécies Gram-positivas.

Os extratos aquosos das esponjas marinhas *Amphimedon compressa* e *Pseudosuberites* sp. possuem não somente uma alta capacidade inibitória como também bactericida. Quanto às demais esponjas, apesar de necessitarem uma concentração maior com relação à concentração inibitória, os extratos ainda são considerados com alto potencial antibacteriano, como podemos observar na tabela 5.

**Tabela 5** - Ensaio de Concentração Bactericida Mínima (CBM) dos extratos aquosos de organismos marinhos.

<b>Amostras</b>	<b><i>E. coli</i></b>	<b><i>S. aureus</i></b>	<b><i>S. epidermidis</i></b>
<i>Amphimedon compressa</i>	62,5	62,5	62,5
<i>Pseudosuberites</i> sp.	62,5	125	62,5
<i>Mycale</i> sp.	-	250	62,5
<i>Aplysina fulva</i>	-	250	250
<i>Topsentia ophiraphidites</i>	-	250	500
<i>Ircinia felix</i>	-	500	500
<i>Aplysina lactuca</i>	-	500	500

Fonte: O próprio autor. Experimento realizado nas concentrações com atividade inibitória bacteriana visualizada no CIM.

Os demais extratos mantiveram capacidade bactericida semelhante à inibitória e esses resultados demonstram que possuem moléculas com tal potencialidade que, em estudos futuros, podem ser identificadas e isoladas. Diversos fatores podem influenciar a concentração

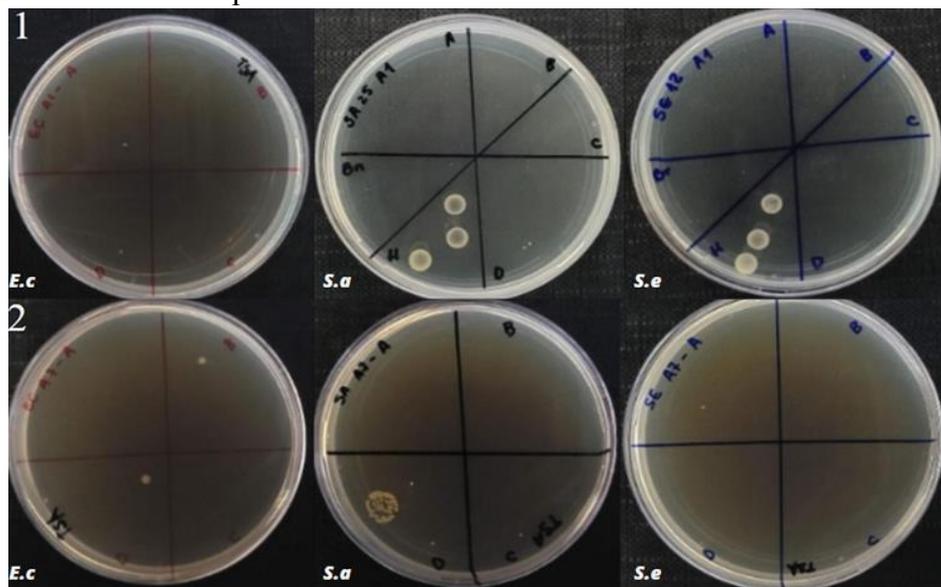
de metabólitos como a época do ano de quando a amostra foi coletada, a ação de proteases, poluição, salinidade e o tipo de extração (PÉREZ; FALQUÉ; DOMÍNGUEZ, 2016).

Alguns dos extratos dos organismos marinhos coletados que apresentaram resultado inibitório no ensaio antibiograma foram submetidos ao ensaio de Concentração Inibitória Mínima (CIM), mas não foram observados resultados. Isso se deve às diferentes concentrações utilizadas nos testes, onde no ensaio antibiograma foi utilizada uma concentração de 200  $\mu\text{g}$  de amostra nos discos e no ensaio de CIM foi utilizada uma concentração de 500  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , que equivale a 50  $\mu\text{g}$  de amostra no poço. A ausência de inibição bacteriana pode ser reavaliada em ensaios que utilizem concentrações superiores ao equivalente de 50  $\mu\text{g}$  de amostra.

A concentração das moléculas bioativas no extrato testado é um fator limitante para um resultado qualitativo, já que somente tendo a molécula isolada e purificada pode-se realizar um estudo comparativo e assim analisar os resultados de forma qualitativa. Ainda assim, a avaliação obtida com a interpretação dos dados de CIM e CBM são parâmetros para uma posterior aplicação de protocolos de purificação desses compostos de interesse.

Na figura 4 é possível observar os resultados obtidos no ensaio CBM dos extratos aquosos das esponjas marinhas *Amphimedon compressa*, *Pseudosuberites* sp. contra as três espécies bacterianas testadas.

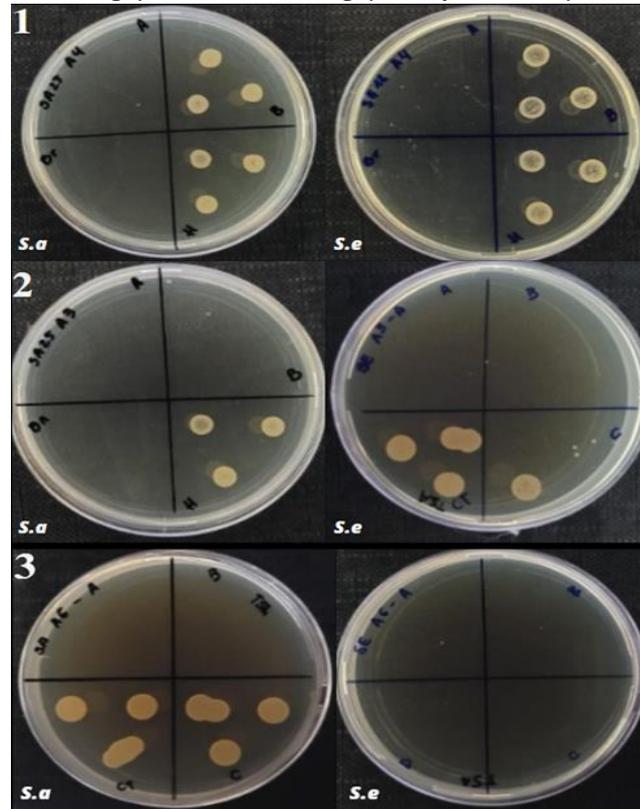
**Figura 4** – Ensaio de Concentração Bactericida Mínima (CBM) dos extratos aquosos de esponjas marinhas *Amphimedon compressa* e *Pseudosuberites* sp.



Fonte: O próprio autor. Legenda: 1: *Amphimedon compressa*; 2: *Pseudosuberites* sp.; A - 500  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ; B - 250  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ; C - 125  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ; D- 62,5  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ; H - Controle; Br-Branco. Um volume de 10  $\mu\text{L}$  de cada triplicata foi retirado do poço onde foi realizado o ensaio de CIM.

A figura 5 apresenta os efeitos dos extratos aquosos das esponjas marinhas *Aplysina lactuca*, *Aplysina fulva* e *Mycale* sp. contra as espécies Gram-positivas.

**Figura 5** – Ensaio de Concentração Bactericida Mínima (CBM) dos extratos aquosos de esponjas marinhas *Aplysina lactuca*, *Aplysina fulva* e *Mycale* sp.



Fonte: O próprio autor. Legenda: 1: *Aplysina lactuca*; 2: *Aplysina fulva*; 3: *Mycale* sp.; A - 500  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ; B - 250  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ; C - 125  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ; D- 62,5  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ; H - Controle; Br- Branco. Um volume de 10  $\mu\text{L}$  de cada triplicata foi retirado do poço onde foi realizado o ensaio de CIM.

É válido destacar que houve uma maior eficiência contra as espécies do gênero *Staphylococcus* e isso é justificado por serem bactérias Gram-positivas, ou seja, possuem uma parede celular composta por uma camada espessa de peptidoglicanos e ácidos teicóicos. Essa parede não é tão complexa quanto à parede celular das bactérias Gram-negativas, como a *E. coli*, que possuem uma bicamada lipídica contendo lipopolissacarídeos, lipoproteínas e porinas, que as tornam mais resistentes a antibióticos e outros medicamentos (TAVARES *et al.*, 2020).

À vista disso, é possível concluir que as bactérias Gram-positivas são mais facilmente inibidas e eliminadas por agentes antibacterianos do que as bactérias Gram-negativas, uma

vez que muitos compostos antibióticos devem passar primeiro pela membrana externa das bactérias Gram-negativas para chegarem a seus alvos e ao ocorrer alterações nessa membrana, como mudança nas propriedades hidrofóbicas ou mutações nas porinas, os mecanismos de reparo são responsáveis por tornar a membrana danificada mais resistente ao composto que a danificou (BREIJYEH; JUBEH; KARAMAN, 2020).

De acordo com Bishen (2023), as bactérias resistentes a antibióticos foram responsáveis diretamente por 1.27 milhões de mortes e contribuíram indiretamente para 4.95 milhões de óbitos em 2019, além de uma estimativa de serem os vetores responsáveis por 10 milhões de mortes por ano em 2050. Diante de resultados promissores da capacidade bactericida das amostras testadas no presente estudo se faz necessário estudo na busca, caracterização e purificação desses compostos, que podem se tornar ferramentas no combate contra as bactérias multirresistentes.

## 5. CONCLUSÃO

Do total de 50 organismos marinhos coletados, 12 organismos mostraram resultado positivo em extrato aquoso e 17 organismos se mostraram eficazes em extrato orgânico, contra pelo menos uma das espécies testadas. Em condições aquosas, houve a predominância de atividade antibacteriana em biomoléculas de esponjas marinhas, já nos extratos orgânicos, a eficiência distribuiu-se entre moluscos, esponjas e macroalgas. Dentre os extratos testados, as esponjas marinhas *Amphimedon compressa*, *Pseudosuberites* sp., *Agelas sventres*, as esponjas do gênero *Aplysina* e os moluscos *Echinometra lucunter* e *Pugilina morio* apresentaram resultados que as colocam como as espécies destaque do presente estudo.

O estudo evidencia que os organismos marinhos seguem sendo uma fonte promissora de compostos bioativos que podem ser usados para lidar com a pouca diversidade de antibióticos que possuem eficácia contra espécies bacterianas resistentes. As esponjas e macroalgas marinhas seguem sendo a fonte mais auspiciosa de metabólitos de interesse.

## REFERÊNCIAS

- ARAGUAIA, M. Importância das bactérias para a manutenção da vida. **Brasil Escola**, 2007. Disponível em: <https://brasilecola.uol.com.br/biologia/importancia-bacterias.htm>. Acesso em: 09 jun. 2023.
- BARCELOS, M. *et al.* The colors of biotechnology: general overview and developments of white, green and blue areas. **FEMS Microbiology Letters**, v. 365, n. 21, p. 239, 2018.
- BISHEN, S. What is antimicrobial resistance and how can we tackle it? **World Economic Forum**, 2023. Disponível em: <https://www.weforum.org/agenda/2023/03/antimicrobial-resistance-superbugs-antibiotics/>. Acesso em: 25 jun. 2023.
- BREIJYEH, Z.; JUBEH, B.; KARAMAN, R. Resistance of gram-negative bacteria to current antibacterial agents and approaches to resolve it. **Molecules**, v. 25, n. 6, p. 1340, 2020.
- CABRAL, D. **Por que conhecemos mais sobre o universo do que o próprio oceano?**, Deviante, 2020. Disponível em: <https://www.deviante.com.br/noticias/por-que-conhecemos-mais-sobre-o-universo-do-que-o-prprio-oceano/>. Acesso em: 25 jun. 2023.
- COSTA-LOTUFO, L. *et al.* Bioprospecting macroalgae, marine and terrestrial invertebrates & their associated microbiota. **Biota Neotropica**, v. 22, 2022.
- ELADLI, M. *et al.* Antibiotic-resistant *Staphylococcus epidermidis* isolated from patients and healthy students comparing with antibiotic-resistant bacteria isolated from pasteurized milk. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 26, n. 6, p. 1285-1290, 2019.
- HIRAI, K. C. **Microbiologia: *Staphylococcus epidermidis***. Analytica, 2020. Disponível em: <https://revistaanalytica.com.br/microbiologia-staphylococcus-epidermidis/#:~:text=O%20Staphylococcus%20epidermidis%20é%20uma,as%20axilas%2C%20narinhas%2C%20etc>. Acesso em: 18 jun. 2023.
- HOWDEN, B. P. *et al.* *Staphylococcus aureus* host interactions and adaptation. **Nature Reviews Microbiology**, p. 1-16, 2023.
- IBRAHIM, O. *Staphylococcus aureus* a Gram-positive Coccid Bacterium Causing Microbial Infections, and Toxins Symptoms Including Food Poisoning. **EC Microbiology**, v. 16, n. 11, p. 61-76, 2020.
- INDRANINGRAT, A. *et al.* Cultivation of sponge-associated bacteria from *Agelas sventres* and *Xestospongia muta* collected from different depths. **Marine Drugs**, v. 17, n. 10, p. 578, 2019.
- KAPER, J.; NATARO, J.; MOBLEY, H. Pathogenic *Escherichia coli*. **Nature Reviews Microbiology**, v. 2, p. 123–140, 2004.

KARTHIKEYAN, A.; JOSEPH, A.; NAIR, B. G. Promising bioactive compounds from the marine environment and their potential effects on various diseases. **Journal of Genetic Engineering and Biotechnology**, v. 20, n. 1, p. 1-38, 2022.

KOSSUGA, M. *et al.* Isolation and biological activities of secondary metabolites from the sponges *Monanchora* aff. *Arbuscula*, *Aplysina* sp., *Petromica ciocalyptoides* and *Topsentia ophiraphidies*, from the ascidian *Didemnum ligulum* and from the octocoral *Carijoa riisei*. **Quimica Nova**, v. 30, 2007.

LACERDA, R. Alcaloides Marinheiros Bromopirrólicos. **Revista Virtual de Química**, v. 7, n. 2, p. 713-729, 2015.

LEE, E; ANJUM, F. *Staphylococcus epidermidis*. 2020. **StatPearls [Internet]**. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK563240/#:~:text=Staphylococcus%20epidermidis%20can%20cause%20infections,of%20the%20infection%2C%20and%20sepsis>. Acesso em: 20 jun. 2023.

LEMOS, M. *Escherichia coli (E. coli): o que é, sintomas, transmissão e tratamento*. Tua Saúde, 2022. Disponível em: <https://www.tuasaude.com/escherichia-coli/>. Acesso em: 08 jun. 2023.

LHULLIER, C. *et al.* Atividades biológicas de extratos de invertebrados marinhos da costa nordeste do Brasil. **Brazilian Journal of Biology**, v. 80, p. 393-404, 2019.

MARTINS, A. P. *et al.* Biotechnological potential of benthic marine algae collected along the Brazilian coast. **Algal Research**, v. 33, p. 316-327, 2018.

MATSUYAMA, K. *et al.* New halogenated C15 acetogenins from Okinawan sea hare *Aplysia dactylomela*. **Tetrahedron**, v. 120, 2022.

MAYER, A. *et al.* Review Marine Pharmacology in 2018: Marine Compounds with Antibacterial, Antidiabetic, Antifungal, Anti-Inflammatory, Antiprotozoal, Antituberculosis and Antiviral Activities; Affecting the Immune and Nervous Systems, and other Miscellaneous Mechanisms of Action. **Pharmacological Research**, 2022.

MELO, V. *et al.* Purification of a novel antibacterial and haemagglutinating protein from the purple gland of the sea hare, *Aplysia dactylomela* Rang, 1828. **Toxicon**, v. 38, n. 10, p. 1415-1427, 2000.

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.

MIGOTTO, A.; MARQUES, A. **Avaliação do estado do conhecimento da diversidade biológica do Brasil: invertebrados marinhos - versão preliminar**. Brasília: Centro de Biologia Marinha, Universidade de São Paulo. Disponível em: [http://www.mma.gov.br/estruturas/chm/\\_arquivos/invmar1.pdf](http://www.mma.gov.br/estruturas/chm/_arquivos/invmar1.pdf). Acesso em: 03 jul. 2023. , 2003.

MOURA, R. *et al.* Hemagglutinating/Hemolytic activities in extracts of marine invertebrates from the Brazilian coast and isolation of two lectins from the marine sponge *Cliona varians* and the sea cucumber *Holothuria grisea*. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 87, p. 973-984, 2015.

NCCLS - NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS (UNITED STATES). Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests. **National Committee for Clinical Laboratory Standards**, 2003.

PEREZ, C. *et al.* **Biodiversidade de Invertebrados Marinhos com Potencial Biotecnológico**. Biotecnologia Marinha, 2020. Disponível em: [https://www.researchgate.net/publication/344724071\\_Biodiversidade\\_de\\_Invertebrados\\_Marinhos\\_com\\_Potencial\\_Biotecnologico](https://www.researchgate.net/publication/344724071_Biodiversidade_de_Invertebrados_Marinhos_com_Potencial_Biotecnologico). Acesso em: 10 jun. 2023.

PÉREZ, M.; FALQUÉ, E.; DOMÍNGUEZ, H. Antimicrobial action of compounds from marine seaweed. **Marine Drugs**, v. 14, n. 3, p. 52, 2016.

PHAM, P. Medical biotechnology: Techniques and applications. **Omics technologies and bio-engineering**, p. 449-469, 2018.

ROMANO, G. *et al.* Biomaterials and bioactive natural products from marine invertebrates: From basic research to innovative applications. **Marine Drugs**, v. 20, n. 4, p. 219, 2022.

ROTTER, A. *et al.* The essentials of marine biotechnology. **Frontiers in Marine Science**, v. 8, p. 158, 2021.

SANTOS, V. S. **Bactérias**. Brasil Escola, 2007. Disponível em: <https://brasilecola.uol.com.br/biologia/bacterias.htm>. Acesso em: 08 jun. 2023.

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.

SCHÖFER, H. *et al.* Diagnosis and treatment of *Staphylococcus aureus* infections of the skin and mucous membranes. **Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft**, v. 9, n. 11, p. 953-967, 2011.

SELEGHIM, M. *et al.* Antibiotic, cytotoxic and enzyme inhibitory activity of crude extracts from Brazilian marine invertebrates. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, p. 287-318, 2007.

SHADY, N. *et al.* Natural product repertoire of the Genus *Amphimedon*. **Marine Drugs**, v. 17, n. 1, p. 19, 2018.

SHANNON, E.; ABU-GHANNAM, N. Antibacterial derivatives of marine algae: An overview of pharmacological mechanisms and applications. **Marine Drugs**, v. 14, n. 4, p. 81, 2016.

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

TAYLOR, T.; UNAKAL, CHANDRASHEKHAR G. *Staphylococcus aureus*. StatPearls Publishing, 2017. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK441868/>. Acesso em: 20 jun. 2023.

VAN DEN HONERT, M.; GOUWS, P.; HOFFMAN, L. A preliminary study: Antibiotic resistance of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* from the meat and feces of various South African wildlife species. **Food Science of Animal Resources**, v. 41, n. 1, p. 135, 2021.

WAYNE, P. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically. Approved standard 10th edition. **Clinical and Laboratory Standards Institute**, CLSI document M07-A10, 2015.

ZHANG, H. *et al.* Bioactive secondary metabolites from the marine sponge genus *Agelas*. **Marine Drugs**, v. 15, n. 11, p. 351, 2017.