



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS (UFG)
INSTITUTO DE QUÍMICA (IQ)
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA (PPGEQ)

THAIRYNE NARUAN ALVES PEREIRA

**Avaliação da atividade hemaglutinante e antibacteriana dos
extratos proteicos intracelulares e extracelulares de bactérias
isoladas a partir de corais marinhos**

GOIÂNIA

2023



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
INSTITUTO DE QUÍMICA

TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO (TECA) PARA DISPONIBILIZAR VERSÕES ELETRÔNICAS DE TESES

E DISSERTAÇÕES NA BIBLIOTECA DIGITAL DA UFG

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás (UFG) a disponibilizar, gratuitamente, por meio da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações (BDTD/UFG), regulamentada pela Resolução CEPEC nº 832/2007, sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a [Lei 9.610/98](#), o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou download, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

O conteúdo das Teses e Dissertações disponibilizado na BDTD/UFG é de responsabilidade exclusiva do autor. Ao encaminhar o produto final, o autor(a) e o(a) orientador(a) firmam o compromisso de que o trabalho não contém nenhuma violação de quaisquer direitos autorais ou outro direito de terceiros.

1. Identificação do material bibliográfico

Dissertação Tese Outro*: _____

*No caso de mestrado/doutorado profissional, indique o formato do Trabalho de Conclusão de Curso, permitido no documento de área, correspondente ao programa de pós-graduação, orientado pela legislação vigente da CAPES.

Exemplos: Estudo de caso ou Revisão sistemática ou outros formatos.

2. Nome completo do autor

Thairyne Naruan Alves Pereira

3. Título do trabalho

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE HEMAGLUTINANTE E ANTIBACTERIANA DOS EXTRATOS PROTEICOS INTRACELULARES E EXTRACELULARES DE BACTÉRIAS ISOLADAS A PARTIR DE CORAIS MARINHOS.

4. Informações de acesso ao documento (este campo deve ser preenchido pelo orientador)

Concorda com a liberação total do documento SIM NÃO¹

[1] Neste caso o documento será embargado por até um ano a partir da data de defesa. Após esse período, a possível disponibilização ocorrerá apenas mediante:

a) consulta ao(a) autor(a) e ao(a) orientador(a);

b) novo Termo de Ciência e de Autorização (TECA) assinado e inserido no arquivo da tese ou dissertação.

O documento não será disponibilizado durante o período de embargo.

Casos de embargo:

- Solicitação de registro de patente;
- Submissão de artigo em revista científica;
- Publicação como capítulo de livro;
- Publicação da dissertação/tese em livro.

Obs. Este termo deverá ser assinado no SEI pelo orientador e pelo autor.



Documento assinado eletronicamente por **Gabriel Luis Castiglioni, Professor do Magistério Superior**, em 15/05/2023, às 08:02, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Thairyne Naruan Alves Pereira, Discente**, em 16/05/2023, às 15:47, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **3746466** e o código CRC **EF5549D1**.

THAIRYNE NARUAN ALVES PEREIRA

Avaliação da atividade hemaglutinante e antibacteriana dos extratos proteicos intracelulares e extracelulares de bactérias isoladas a partir de corais marinhos

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química (PPGEQ), do Instituto de Química (IQ), da Universidade Federal de Goiás (UFG), como requisito para a obtenção do título de Mestra em Engenharia Química.

Área de Concentração: Desenvolvimento de Processos
Linha da Pesquisa: Engenharia Bioquímica

Orientador: Professor Doutor Gabriel Luis Castiglioni

GOIÂNIA
2023

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UFG.

Pereira, Thairyne Naruan Alves
AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE HEMAGLUTINANTE E
ANTIBACTERIANA DOS EXTRATOS PROTEICOS
INTRACELULARES E EXTRACELULARES DE BACTÉRIAS
ISOLADAS A PARTIR DE CORAIS MARINHOS [manuscrito] /
Thairyne Naruan Alves Pereira. - 2023.
50 f.

Orientador: Prof. Dr. Gabriel Luis Castiglioni.
Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Goiás, Instituto
de Química (IQ), Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química,
Goiânia, 2023.

Bibliografia.

Inclui abreviaturas, lista de figuras, lista de tabelas.

1. Corais de viveiro. 2. bactérias marinhas. 3. potencial
antibacteriano. I. Castiglioni, Gabriel Luis, orient. II. Título.

CDU 66.0



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS

INSTITUTO DE QUÍMICA

ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO

Ata nº **54** da sessão da Defesa de Mestrado de **Thairyne Naruan Alves Pereira**, que confere o título de **Mestra em Engenharia Química**, na área de concentração em **Desenvolvimento de Processos**.

Aos **30 (trinta) dias do mês de março de 2023 (dois mil e vinte e três)**, a partir das **09h00m**, via **videoconferência**, realizou-se a sessão pública da Defesa de Mestrado intitulada " **AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE HEMAGLUTINANTE E ANTIBACTERIANA DOS EXTRATOS PROTEICOS INTRACELULARES E EXTRACELULARES DE BACTÉRIAS ISOLADAS A PARTIR DE CORAIS MARINHOS**". Os trabalhos foram instalados pelo Orientador, **Prof. Dr. Gabriel Luis Castiglioni (UFG)**, com a participação dos demais membros da Banca Examinadora: **Prof^ª. Dr^ª. Lidia Guillo (UFG)** e **Prof. Dr. Franciolo Vendruscolo (UFG)**. Durante a arguição os membros da banca não fizeram sugestão de alteração do título do trabalho. A Banca Examinadora reuniu-se em sessão secreta a fim de concluir o julgamento da Defesa de Mestrado, tendo sido a candidata **aprovada** pelos seus membros. Proclamados os resultados pelo Prof. Dr. Gabriel Luis Castiglioni, Presidente da Banca Examinadora, foram encerrados os trabalhos e, para constar, lavrou-se a presente ata que é assinada pelos Membros da Banca Examinadora, aos 30 (trinta) dias do mês de março de 2023 (dois mil e vinte e três).

TÍTULO SUGERIDO PELA BANCA



Documento assinado eletronicamente por **Gabriel Luis Castiglioni, Professor do Magistério Superior**, em 04/04/2023, às 08:14, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Lidia Andreu Guillo, Professora do Magistério Superior**, em 26/04/2023, às 10:03, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Franciolo Vendruscolo, Professor do Magistério Superior**, em 26/04/2023, às 11:51, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).

A autenticidade deste documento pode ser conferida no site
[https://sei.ufg.br/sei/controlador_externo.php?](https://sei.ufg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_visualiz...b8abc22b54c01a870e753b7ec5b25992253be17d2562a1fa516dcdc16fa8b)



[acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0](#), informando o código verificador **3629418** e o código CRC **A3FC188E**.

Referência: Processo nº 23070.015769/2023-07

SEI nº 3629418

Criado por [thaisamorim](#), versão 2 por [thaisamorim](#) em 28/03/2023 15:40:11.

RESUMO

Por décadas, o ambiente terrestre foi o centro dos estudos, entretanto, as pesquisas foram estendidas do âmbito terrestre para o marinho, a fim de se descobrir novas moléculas. Os corais são animais marinhos que estão presente em mares, oceanos e viveiros marinhos. Esses animais podem viver em simbiose com diversos organismos, dentre eles as bactérias produtoras de moléculas com alto interesse biotecnológico. A partir da coleta, isolamento e cultivo destes organismos, é possível obter moléculas de interesse biotecnológico. Nesse contexto, este estudo tem por objetivo o isolamento de colônias de bactérias a partir de corais marinhos, avaliar a atividade hemaglutinante, e a atividade antibacteriana dos extratos proteicos intracelulares e extracelulares das colônias de bactérias isoladas dos corais *Green Star Polyps* e *Xenia Pompom*, e obter o perfil proteico dos extratos a partir da eletroforese SDS-PAGE. Foram isoladas 18 colônias de bactérias, sendo 9 colônias provenientes de cada coral. Os extratos brutos foram obtidos a partir do cultivo das bactérias isoladas em dois meios de cultura diferentes, que posteriormente foram submetidos a 60% de saturação com sulfato de amônio. Para a atividade hemaglutinante, apenas os extratos extracelulares apresentaram atividade, o que permite inferir que podem conter proteínas que apresentam diferentes atividades biológicas, tais como, antibacteriana e antiviral. Portanto foi realizado a inibição por carboidrato, no entanto, não houve inibição da atividade hemaglutinante para o os seguintes açúcares testados, galactose, frutose, maltose, glicose, xilose, rhaminose e sacarose. Portanto esses extratos extracelulares foram submetidos a atividade antibacteriana, que foi determinada pelo método da Concentração Mínima Inibitória (CMI), pela técnica de microdiluição em caldo, contra os micro-organismos *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Salmonella typhimurium*, e *Enterococcus faecalis*. Verificou-se atividade antibacteriana de três (E1 G13, E2 G13 e E2 P2) dos quatro extratos proteicos contra *Enterococcus faecalis*. Os extratos proteicos E1 G13, E2 G13 e E1 P2 apresentaram inibição de crescimento microbiano contra outra cepa testada, obtendo concentração de $1000 \mu\text{g.mL}^{-1}$ para *Escherichia coli*. Os quatro extratos proteicos extracelulares obtiveram hemaglutinação para os três tipos sanguíneos testados e, apresentam-se como promissores agentes antibacterianos, podendo contribuir para a ampliação de produtos naturais de origem marinha.

Palavras-chave: Corais de viveiro, bactérias marinhas, potencial antibacteriano.

ABSTRACT

For decades, the terrestrial environment was the center of studies, however, research was extended from the terrestrial to the marine scope, in order to discover new molecules. Corals are marine animals that are present in seas, oceans and marine nurseries. These animals can live in symbiosis with several organisms, including bacteria that produce molecules of high biotechnological interest. From the collection, isolation and cultivation of these organisms, it is possible to obtain molecules of biotechnological interest. In this context, this study aims to isolate bacterial colonies from marine corals, evaluate the hemagglutinating activity and antibacterial activity of intracellular and extracellular protein extracts from bacterial colonies isolated from *Green Star Polyps* and *Xenia Pompom* corals, and obtain the protein profile of the extracts from SDS-PAGE electrophoresis. Eighteen colonies of bacteria were isolated, 9 colonies from each coral. Crude extracts were obtained from the cultivation of isolated bacteria in two different culture media, which were subsequently subjected to 60% saturation with ammonium sulfate. For the hemagglutinating activity, only the extracellular extracts showed activity, which allows inferring that they may contain proteins that have different biological activities, such as antibacterial and antiviral. Therefore, carbohydrate inhibition was performed, however, there was no inhibition of hemagglutinating activity for the following sugars tested, galactose, fructose, maltose, glucose, xylose, rhaminose and sucrose. Therefore, these extracellular extracts were subjected to antibacterial activity, which was determined by the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) method, by the broth microdilution technique, against the microorganisms *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Salmonella typhimurium*, and *Enterococcus faecalis*. There was antibacterial activity of three (E1 G13, E2 G13 and E2 P2) of the four protein extracts against *Enterococcus faecalis*. Protein extracts E1 G13, E2 G13 and E1 P2 showed inhibition of microbial growth against another strain tested, obtaining a concentration of 1000 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ for *Escherichia coli*. The four extracellular protein extracts obtained hemagglutination for the three blood types tested and are promising antibacterial agents, which can contribute to the expansion of natural products of marine origin.

Keywords: Aquarius corals, marine bacteria, antibacterial potential.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	10
2. OBEJTIVOS	12
2.1. OBEJTIVO GERAL.....	12
2.2. OBEJTIVOS ESPECÍFICOS	12
3. REFERENCIAL TEÓRICO	13
3.1. CORAIS.....	13
3.2. BACTÉRIAS MARINHAS.....	14
3.3. RELAÇÃO CORAL-BACTÉRIA.....	15
3.4. PRODUTOS NATURAIS MARINHOS E SEUS POTENCIAIS BIOLÓGICOS	16
3.5. BACTÉRIAS DE INTERSSE CLÍNICO: <i>Enterococcus faecalis</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Escherichia coli</i> e <i>Salmonella typhimurium</i>	19
4. MATERIAL E MÉTODOS	21
4.1. MATERIAL.....	21
4.1.1. Corais marinhos e isolamento das bactérias	21
4.1.2. Reativação das bactérias	22
4.2. MÉTODOS	22
4.2.1. Cultivo das bactérias G13 e P2.....	23
4.2.2. Preparação dos extratos proteicos	24
4.2.2.1 Sobrenadante do cultivo das bactérias	24
4.2.2.2 Biomassa do cultivo das bactérias	24
4.2.3. Análise de coloração de Gram nas bactérias G13 e P2	24
4.2.4. Atividade hemaglutinante.....	25
4.2.4.1. Inibição da atividade hemaglutinante por carboidratos	25
4.2.5 Eletroforese SDS-PAGE	26
4.2.6. Atividade Antibacteriana.....	26
4.2.6.1 Micro-organismos	26
4.2.6.2 Manutenção das cepas.	26
4.2.6.3 Padronização da suspensão bacteriana	27
4.2.6.4 Determinação da Concentração Mínima Inibitória (CMI) pelo método de microdiluição em caldo.	27

4.2.6.5 Controles	28
4.2.6.6 Avaliação da atividade antibacteriana	29
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	30
5.1. ISOLAMENTO DAS COLÔNIAS DE BACTÉRIAS ASSOCIADAS AOS CORAIS	30
5.2. MORFOLOGIA DAS BACTÉRIA G13 E P2	31
5.3. ATIVIDADE HEMAGLUTINANTE DOS EXTRATOS PROTEICOS	33
5.3.1 Inibição da atividade hemaglutinante por carboidratos para os extratos proteicos extracelulares.	35
5.4 OBTENÇÃO E ELETROFORESE SDS-PAGE DAS PROTEÍNAS OBTIDAS A PARTIR DOS EXTRATOS PROTEICOS	40
5.5. ATIVIDADE ANTIBACTERIANA NOS EXTRATOS PROETICOS EXTRACELULARES.....	42
6. CONCLUSÃO.....	45
7. REFERÊNCIAS.....	46

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Compostos antimicrobianos isolados a partir de bactérias	15
Tabela 2: Lista de patógenos prioritários listados pela OMS	19
Tabela 3: Extratos proteicos intracelulares e extracelulares das bactérias P2 e G13.	24
Tabela 4: Classificação da atividade antibacteriana	29
Tabela 5: Codificação das colônias de bactérias isoladas dos corais <i>Xenia Pompom</i> e <i>Green Star Polyps</i>	31
Tabela 6: Massas moleculares dos extratos proteicos extracelulares	41
Tabela 7: Concentração mínima inibitória dos extratos proteicos extracelulares.	42

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Distribuição de micro-organismos nos tecidos dos corais.	13
Figura 2: Representação esquemática das etapas de isolamento de um metabólito ativo.	17
Figura 3: Tendências em novas descobertas de produtos naturais marinhos.	18
Figura 4: Coral <i>Xenia Pompom</i>	21
Figura 5: Coral <i>Green Star Polyps</i>	22
Figura 6: Fluxograma da metodologia desenvolvida para avaliação da atividade hemaglutinante e antibacteriana dos extratos proteicos intracelulares e extracelulares das colônias das bactérias marinhas.	23
Figura 7: Tipos de aglutinação.	25
Figura 8: Esquema da microplaca no ensaio de determinação CMI	28
Figura 9: Colônias de bactérias isoladas a partir do coral <i>Xenia Pompom</i>	30
Figura 10: Colônias de bactérias isoladas a partir do coral <i>Green Star Polyps</i>	30
Figura 11: Morfologia da bactéria G13	32
Figura 12: Morfologia da bactéria P2.....	32
Figura 13: Atividade hemaglutinante dos extratos proteicos intracelulares e extracelulares G13	33
Figura 14: Atividade hemaglutinante dos extratos proteicos intracelulares e extracelulares P2.....	34
Figura 15: Inibição da atividade hemaglutinante para o extrato extracelular E1 G13.	36
Figura 16: Inibição da atividade hemaglutinante para o extrato extracelular E2 G13.	37
Figura 17: Inibição da atividade hemaglutinante para o extrato extracelular E1 P2.	38
Figura 18: Inibição da atividade hemaglutinante para o extrato extracelular E2 P2.	39
Figura 19: Eletroforese SDS-PAGE dos extratos proteicos E2 P2, E2 G13, E1 P2, E1 G13.....	40

LISTA DE ABREVIATURAS

BOD - Demanda Bioquímica de Oxigênio;

CMI – Concentração Mínima Inibitória;

CMH – Caldo Mueller Hinton.

1. INTRODUÇÃO

Os estudos visando a descoberta de novos produtos, tem tido uma maior demanda nas últimas décadas. Diante da necessidade de novas terapias, a prospecção de novas moléculas, seja em ambiente terrestre ou marinho, ganhou um caráter de urgência dentro da ciência. Assim, existe uma necessidade em encontrar novas moléculas antibacterianas que atuem, preferencialmente por meio de outros mecanismos que não os antibióticos atuais, bem como em associar essas novas moléculas a medicamentos já existentes (REICHMANN; PINTO, 2017).

Um dos maiores desafios atuais consiste na elaboração de estratégias alternativas, que sejam eficazes no controle de patógenos humanos e, ao mesmo tempo, menos tóxicas. Ainda, é importante a busca por novos agentes antimicrobianos a fim de aumentar as possibilidades de rotatividade e assim minimizar a pressão seletiva que favorece o estabelecimento da resistência (SILVA, 2019).

O controle alternativo de doenças humanas visa diminuir os prejuízos trazidos pelos mesmos com um menor impacto ambiental e menor risco a saúde humana, além de diminuir custos quando comparado ao emprego de métodos químicos tradicionais. O emprego de compostos naturais vem se mostrando uma ótima ferramenta para esse controle, como o uso de extratos, metabólitos secundários e plantas medicinais (FERREIRA *et al.*, 2018).

Devido à atual necessidade de novos tipos de antimicrobianos para controlar patógenos multirresistentes e novos agentes infecciosos emergentes, a diversidade marinha torna-se uma das alternativas promissoras para a busca de novos antibióticos. Os micro-organismos, incluindo fungos, cianobactérias e bactérias, têm atraído a comunidade de produtos naturais em todo o mundo e também no Brasil, recebendo atenção significativa como os verdadeiros produtores da maioria dos compostos bioativos isolados de invertebrados marinhos (IÓCA *et al.*, 2014).

A diversidade microbiana que existe no vasto ambiente marinho é pouco conhecida, por isso a busca contínua por novas moléculas com potencial terapêutico, como por exemplo, no período entre 2013 a 2015 foram descritos aproximadamente 1.040 novos compostos, demonstrando que ainda existe um enorme recurso de produtos naturais marinhos esperando para ser explorado (BLUNT *et al.*, 2016).

Existe uma variedade de compostos bioativos com diversas funções isoladas de bactérias, com atividade citotóxica, anticancerígena, fotoprotetora, antiproliferativa, antitumoral, assim como propriedades antimicrobianas. São diversos os estudos que relacionam

o potencial promissor de bactérias marinhas em relação à produção de compostos com atividades antimicrobianas, de diversas classes e espectros de ação contra os mais diversos micro-organismos. Compostos de origem marinha isolados de invertebrados, algas e micro-organismos apresentam diversas e potentes atividades biológicas, incluindo antibacteriana, anticoagulante, antifúngica, anti-inflamatória, antimalárica e antiviral (THOMPSON; THOMPSON, 2020).

Compostos que apresentam atividade antimicrobiana são potenciais para o desenvolvimento de novos antibióticos, visto que o desenvolvimento com novas classes estruturais é essencial por algumas razões. São elas, a resistência dos micro-organismos aos antimicrobianos disponíveis está aumentando, assim como a natureza tóxica de alguns dos medicamentos atualmente disponíveis, o que delimita seu uso (NWEZE *et al.*, 2020).

Madigan *et al.*, (2016) também destacaram que os fármacos antimicrobianos apresentam alta eficiência no tratamento de infecções bacterianas, por exibirem uma toxicidade seletiva, já que inibem e matam os patógenos, sem afetar adversamente o hospedeiro.

À medida que a busca por novos antibióticos continua, a resistência aos compostos antimicrobianos conhecidos aumenta. Em resposta à resistência aos antibióticos, muitos pesquisadores ao redor do mundo persistem em pesquisar novos compostos antibacterianos em diferentes nichos ecológicos, sendo um deles o ambiente marinho.

Os micro-organismos representam a possibilidade de exploração da diversidade marinha com menor impacto ambiental, visto que o cultivo desses para obtenção de metabólitos é uma alternativa sustentável. Vários compostos antibacterianos foram descobertos no ambiente marinho, e mais agentes antibacterianos ainda são descobertos a cada ano. Até agora, apenas alguns compostos estão em testes pré-clínicos e clínicos. A pesquisa sobre produtos naturais marinhos levou ao isolamento e identificação de vários compostos novos e diversos, que podem até mesmo combater patógenos resistentes a medicamentos.

As bactérias marinhas desempenham um papel central como simbiote da maioria dos invertebrados marinhos e também é um dos recursos biomédicos mais recentes. Portanto, esse estudo visa o isolamento de bactérias a partir de corais marinhos, bem como a avaliação dos extratos proteicos intracelulares e extracelulares quanto a atividade antibacteriana e hemaglutinante. Diante dessa capacidade de descobertas com possibilidade de uso medicinal, esse trabalho se faz importante por ser uma alternativa de origem natural marinha e sustentável, podendo contribuir para o conhecimento de novas substâncias de interesse biotecnológico.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Avaliar a atividade hemaglutinante e antibacteriana dos extratos proteicos intracelulares e extracelulares das bactérias associadas aos corais *Xenia Pompos* e *Green Star Polyps* de viveiro marinho.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Isolar colônias de bactérias a partir de corais marinhos;
- Realizar o cultivo das colônias das bactérias em diferentes meios líquidos para obtenção dos extratos brutos;
- Obter extratos proteicos intracelulares e extracelulares, realizando a precipitação das proteínas com sulfato de amônio;
- Obter o perfil das proteínas presentes nos extratos proteicos por meio da eletroforese SDS-PAGE;
- Investigar a capacidade dos extratos proteicos em aglutinar eritrócitos dos tipos sanguíneos A, B e O, pelo meio da atividade hemaglutinante;
- Investigar o potencial antibacteriano dos extratos proteicos pelo método da concentração mínima inibitória.

3. REFERENCIAL TEÓRICO

3.1. CORAIS

Os corais são invertebrados marinhos que se encontram espalhados pelos mares e oceanos de todo o mundo, podendo ser solitários ou coloniais. O coral e sua microbiota estabelecem uma associação dinâmica entre si, de modo que diferentes condições ambientais selecionam o holobionte mais vantajoso para o contexto das condições prevaletentes, podem ser encontrados até 100 milhões de micro-organismos por cm² em corais, o que corresponde a mais de dez vezes a quantidade de bactérias encontrada na pele humana ou no solo de uma floresta temperada. No que diz respeito às relações estabelecidas entre micro-organismos e corais, chama a atenção o fato de os corais viverem em estreita associação com uma microbiota bastante diversa, composta por organismos como bactérias, arqueias, microalgas, fungos, protozoários e vírus, distribuídos por todo o corpo do animal, conforme Figura 1 (LEITE *et al.*, 2016).

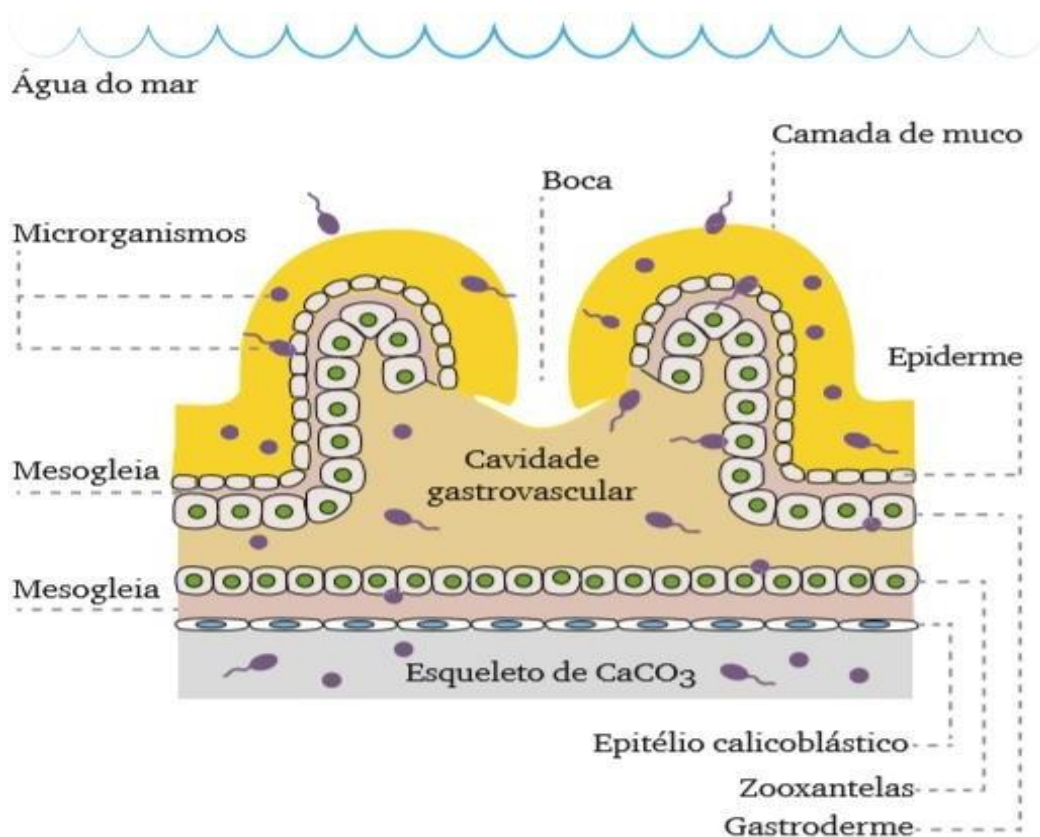


Figura 1: Distribuição de micro-organismos nos tecidos dos corais.

Fonte:(LEITE *et al.*, 2016).

Os corais que secretam um esqueleto de carbonato de cálcio, fornece alguma defesa física contra seus predadores e competidores. A produção de metabólitos secundários também contribui para a defesa. Essas substâncias são de particular interesse, pois possuem um potencial farmacológico considerável. Existem registros na literatura que demonstram o isolamento de metabólitos secundários com atividade biológica provenientes de corais escleractinianos. (BIALONSKA, 2009).

Alguns compostos antimicrobianos foram isolados de corais. São exemplos os diterpenos, sinulariolida e flexibilida, isolados do coral mole australiano *Sinularia flexibilis*. Uma bactéria endofítica de pigmento amarelado, *Pseudoalteromonas flavipulchra*, foi isolada do coral *Montipora aequituberculata*. Ensaio de antibiograma demonstraram que essa bactéria possuía uma potente atividade contra MRSA (*Staphylococcus aureus* metilina resistente) mediada pela geração de peróxido de hidrogênio, por meio da ativação do L-aminoácido oxidase. Eunicinas foram isoladas dos corais moles *Eunice asperula*, *E. toumeforti* e *E. mammosa*, demonstrando atividades contra *Pseudomonas* e *Staphylococcus aureus* (THOMPSON; THOMPSON, 2020).

3.2. BACTÉRIAS MARINHAS

Embora algumas bactérias permaneçam invisíveis a olho nu, milhões delas tornam-se visíveis, como turbidez em um meio líquido. Para estimular tal crescimento, acrescenta-se uma série de nutrientes, vitaminas e quaisquer outros requerimentos ao meio de cultivo, além de incubá-lo em condições, como temperatura, pH e luminosidade, apropriadas para o crescimento do micro-organismo desejado. Os micro-organismos marinhos tem se mostrado interessantes fontes para busca por moléculas inéditas com aplicação farmacológica devido à variedade de compostos que podem produzir. Os actinomicetos são bactérias Gram positivas que merecem destaque pela sua alta capacidade de produzir uma variedade de metabólitos secundários. Dentre esses, a salinosporamida A, isolada do actinomiceto marinho *Salinispora tropica*, foi o composto que chegou à fase de testes pré-clínicos de forma rápida, onde todo o processo que compreende desde a descoberta até o início dos testes clínicos durou somente três anos (FLÔRENCIO, 2021).

Pesquisas sobre novos metabólitos secundários de origem microbiana levaram recentemente à caracterização de muitas estruturas biologicamente ativas importantes. Isso prova o importante papel dos micro-organismos na descoberta de medicamentos (Tabela 1).

Tabela 1: Compostos antimicrobianos isolados a partir de bactérias.

Organismo Origem	Composto	Micro-organismo alvo
<i>Photobacterium</i> sp.	Ngercheumicinas	Cepas Gram-negativas
<i>Photobacterium</i> sp	Solonamidina A e B	<i>MRSA</i> (<i>Staphylococcus aureus</i> resistente à metilina)
<i>Pseudomonas</i> sp.	Ciclo-peptídeo	<i>S. aureus</i> , <i>M. luteus</i> , <i>B. subtilis</i> , <i>E. coli</i> , <i>V. anguillarum</i>
<i>Rapidithrix</i> sp.	Ariakemicina A	<i>Brevibacterium</i> sp., <i>S. aureus</i> , <i>B. subtilis</i>
<i>Streptomyces</i> sp.	Anthracimicina	<i>B. anthracis</i> , <i>E. faecalis</i> , <i>S. pneumonia</i> , <i>S.aureus</i> , <i>MSSA</i> , <i>MRSA</i> , <i>VRSA</i>
<i>Streptomyces</i> sp.	Fijimycina A–C e etamycina	<i>MRSA</i>

Fonte: (THOMPSON; THOMPSON, 2020). Adaptado.

3.3. RELAÇÃO CORAL-BACTÉRIA

Para a sobrevivência dos invertebrados marinhos, estes precisam desenvolver a capacidade de produzir compostos tóxicos ou obtê-los por meio de associação com micro-organismos marinhos. A seleção do microbioma também pode ser relevante para a evolução de importantes sistemas bioquímicos e fisiológicos nos corais (BHATTACHARYA, 2016). A conservação do metagenoma, pode ser atribuída ao estabelecimento e manutenção de relações com micróbios fundamentais benéficos, possivelmente por meio de transferência de genes e mecanismos de defesa química (COSTA-LOTUFO, 2018).

A simbiose que existe amplamente na natureza pode ser dividida em três tipos: comensalismo, parasitismo e mutualismo. No comensalismo, apenas um indivíduo associado se beneficia, e a relação simbiótica não afeta negativamente o parceiro. No entanto, no parasitismo, é benéfico para um e prejudicial para outro, enquanto no mutualismo, dois indivíduos associados se beneficiam da relação estabelecida. Os principais benefícios dessas relações incluem proteção, fornecimento de nutrientes escassos ou difíceis de obter.

Uma vez compreendida, a simbiose pode ser alavancada para a produção de produtos químicos pela cultura completa do micróbio responsável ou pelo cultivo do hospedeiro,

mantendo as condições ideais para o simbiote produzir os compostos de interesse (WATERS *et al.*, 2014).

A simbiose pode ser aproveitada não apenas para preencher lacunas de conhecimento sobre a biologia dos micro-organismos, mas também para produzir novos medicamentos (GOGINENI *et al.*, 2020). Por esse motivo, tal estudo tem importante relevância, pois por meio da simbiose entre coral e bactéria é possível investigar compostos com potenciais biológicos.

Os estudos iniciais em busca de novos produtos naturais se concentraram, inicialmente, em invertebrados marinhos como ascídias, esponjas, corais, moluscos, briozoários e sedimentos, além das algas. Inúmeros estudos comprovam a importância dos invertebrados marinhos como fonte de novos compostos de interesse e aplicação biomédica. Em diversos casos, a síntese química de compostos bioativos mostrou-se muito difícil de ser obtida racionalmente, devido à complexidade das moléculas. Mais além, não é econômica nem ecologicamente viável de obter estes compostos diretamente dos organismos hospedeiros. Dessa forma, a prospecção de compostos com potencial biomédico a partir de micro-organismos surge como uma solução sustentável para a exploração dos recursos marinhos como fonte de novos fármacos (CRAGG & NEWMAN, 2016).

3.4. PRODUTOS NATURAIS MARINHOS E SEUS POTENCIAIS BIOLÓGICOS

O Brasil é detentor de uma extensa faixa marítima chamada de “Amazônia Azul”. Esse território é uma Zona Econômica Exclusiva (ZEE) do Brasil, e possui uma dimensão comparável ao da Floresta Amazônica. O litoral brasileiro abrange 8.000 km de regiões tropicais e temperadas que são o habitat de muitos organismos, se tornando uma fonte de novas substâncias, visto que a sua biodiversidade resulta em vasta diversidade genética e, conseqüente, produção de diferentes moléculas que podem apresentar bioatividade de interesse farmacológico (WILKE *et al.*, 2020).

Os produtos naturais podem ser definidos, de forma geral, como as moléculas derivadas de fontes naturais que não estão envolvidas no metabolismo primário do organismo fonte. Estas substâncias são, principalmente, codificadas geneticamente e produzidas por vias metabólicas secundárias, e pertencem às mais diversas classes de substâncias orgânicas além de possuírem diversas funções biológicas (PYE *et al.*, 2017).

O processo de descoberta de novos medicamentos por meio da investigação de produtos naturais marinhos não difere muito dos processos usados em outros produtos naturais, ou mesmo em outros produtos químicos sintéticos. Na primeira etapa, o foco da pesquisa é

identificar novas moléculas com efeitos biológicos evidentes (Figura 2). Após o isolamento e caracterização das moléculas que apresentam efeitos biológicos, há a possibilidade inseri-las em pesquisas e testes para o desenvolvimento de novos produtos.

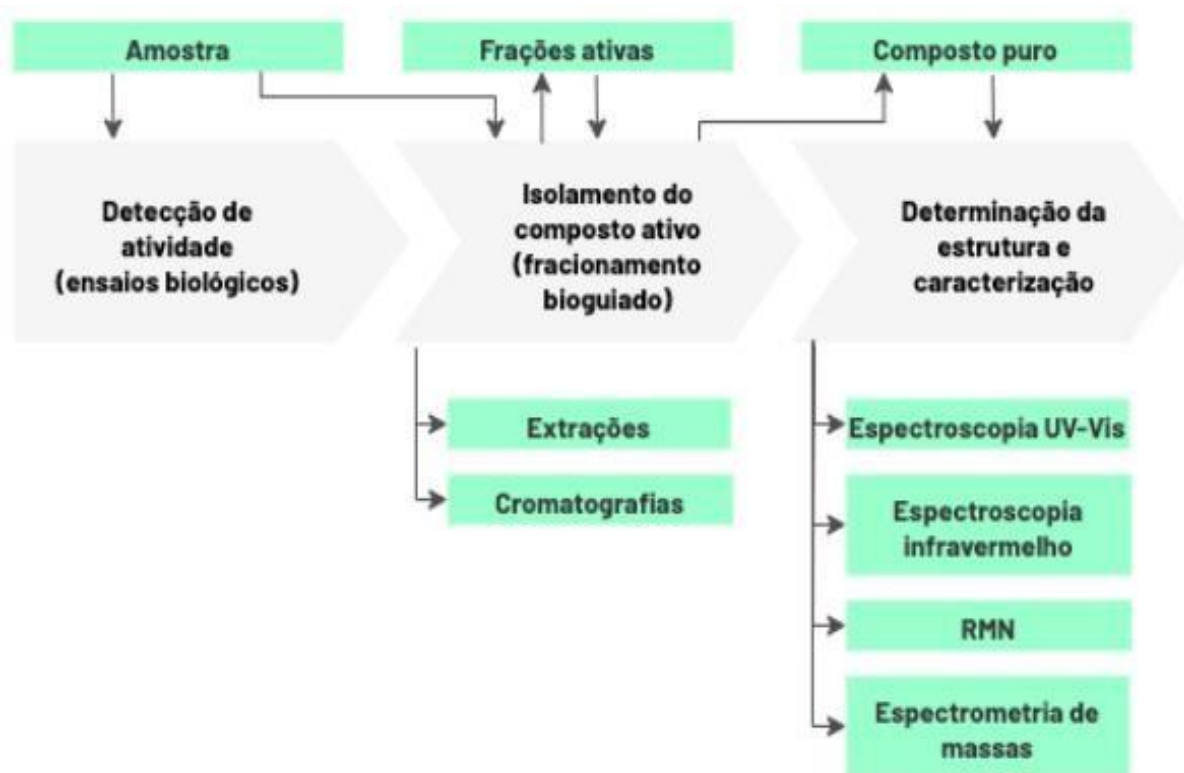


Figura 2: Representação esquemática das etapas de isolamento de um metabólito ativo.

Fonte: (THOMPSON; THOMPSON, 2020).

Nessa etapa inicial, um *screening* biológico é comumente utilizado para avaliar um grande número de amostras. Idealmente, essas análises devem ser simples, específicas, baratas e rápidas, podendo servir aos mais variados objetivos, como inibição do crescimento microbiano, citotoxicidade contra células tumorais ou atividade anti-inflamatória, por exemplo (THOMPSON; THOMPSON, 2020).

Mesmo que ainda com pouco investimento na descoberta de novas substâncias de origem marinha para o lançamento de novos produtos, o número médio de compostos relatados nos três anos anteriores (2016, 2017 e 2018) aumentou, os novos produtos naturais de bactérias marinhas, fungos e cianobactérias aumentaram 22, 85e 61%, respectivamente, conforme Figura 3 (CARROLL *et al.*, 2020).

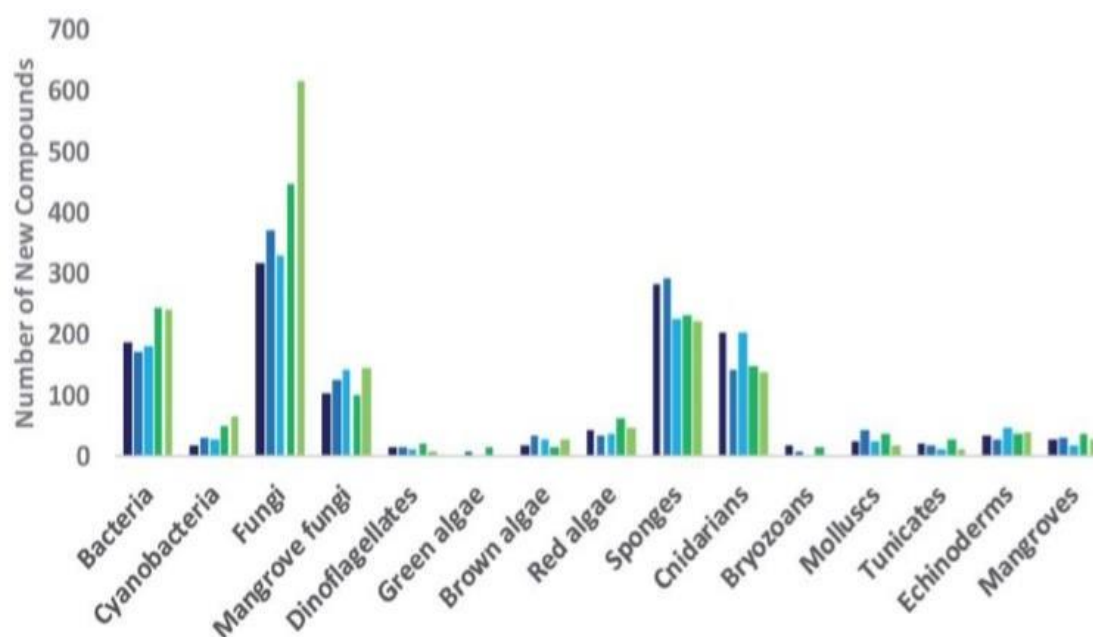


Figura 3: Tendências em novas descobertas de produtos naturais marinhos.

Fonte: (CARROLLI *et al.*, 2020).

Recentemente (Da SILVA *et al.*, 2019), isolou um actinomiceto a partir de sedimentos marinhos, *Salinispora arenicola* (Oceano Atlântico brasileiro), e a partir do caldo de fermentação da bactéria eles identificaram salinaftoquinonas, algumas delas tinham atividade inibitória contra patógenos resistentes a drogas.

A actinobactéria *Streptomyces* sp. BRA-384 foi selecionada entre nove cepas isoladas a partir da *Palythoa caribaeorum* que foi coletada no Estado do Ceará, devido a um extrato de acetato de etila altamente citotóxico contra HCT 116 linha de células cancerosas, da qual 3 novas cromomicinas (A6, A7 e A8), juntamente com um dextrógiro cromomicina A5 foram isolados. As cromomicinas são uma classe promissora de candidatos a anticâncer, e todas as 4 cromomicinas obtidas foram altamente citotóxicos contra um painel de linha celular tumoral, mostrando valores de IC50 na faixa de 0,2 a 133 nM (PINTO *et al.*, 2019).

A antracimicina e a antracimicina B foram obtidas de um actinomiceto recuperado de um coral de água fria. A antracimicina apresentou atividade potente contra um painel de bactérias gram-positivas com CMIs abaixo da concentração de 0,03 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. A antracimicina B também exibiu atividades antibacterianas potentes com CMIs na faixa submicromolar contra a maioria dos patógenos testados (RODRÍGUEZ *et al.*, 2018).

Atualmente, o painel global de medicamentos de origem marinha consiste de sete compostos aprovados pelo FDA (*Food and Drug Administration*, EUA), além de 23 produtos

naturais (ou derivados destes) em diferentes fases dos ensaios clínicos e dezenas de outros compostos naturais em fase de pré-clínica (MAYER *et al.*, 2017).

3.5. BACTÉRIAS DE INTERESSE CLÍNICO: *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* e *Bacillus cereus*.

Embora por muitos anos, as drogas antimicrobianas neutralizaram efetivamente os patógenos, sua potencialidade terapêutica está em risco, pois muitos antibióticos comumente usados já se tornaram menos eficazes contra certas cepas resistentes aos antibióticos. A ineficácia recorrente dos agentes terapêuticos convencionais ocorreu não apenas devido à secreção de novas toxinas microbianas, mas também pelo surgimento de cepas de bactérias multirresistentes, mostrando suscetibilidade insignificante aos antibióticos atuais (NIKALDO, 2009). Assim sendo, a Organização Mundial da Saúde (OMS) enfatizou em alguns relatórios a ameaça global iminente à resistência aos antibióticos, para isso classificou alguns patógenos por grau de prioridade, conforme apresentado na Tabela 2 (OMS, 2017).

Tabela 2: Lista de patógenos prioritários listados pela OMS.

Prioridade	Patógenos
Crítico	<i>Acinetobacter baumannii</i>
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
	<i>Enterobacteriaceae</i>
Alta	<i>Enterococcus faecium</i>
	<i>Staphylococcus aureus</i>
	<i>Helicobacter pylori</i>
	<i>Campylobacter</i> spp.
	<i>Salmonellae</i>
Média	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>
	<i>Streptococcus pneumoniae</i>
	<i>Haemophilus influenzae</i>
	<i>Shigella</i> spp.

Fonte: (OMS, 2017). Adaptado.

As bactérias tornaram-se resistentes a um grande número de antibióticos, incluindo os disponíveis para o tratamento de bactérias multirresistentes. Diante disso, algumas dessas bactérias são apresentadas com os seus respectivos efeitos adversos à saúde.

Dentre as espécies, *Enterococcus faecalis* e *Enterococcus faecium* são frequentemente encontradas nos alimentos e também estão implicadas em infecções em animais e humanos

imunocomprometidos, como bacteremia, septicemia, infecções do trato urinário, infecções de feridas, meningites e endocardites (CAMPOS *et al.*, 2013)

Staphylococcus aureus é um comensal humano que coloniza persistentemente as vias orais anteriores de aproximadamente 20 a 25% da população adulta saudável, enquanto que até 60% são colonizados intermitentemente. O *S. aureus* desenvolveu mecanismos de resistência contra antibióticos, sendo assim, a vancomicina, a daptomicina, a clindamicina e o linezolida são aprovadas para o tratamento de infecções com cepas resistentes aos antibióticos, como *S. aureus* resistente à meticilina - MRSA (ELLIS *et al.*, 2014).

Escherichia coli é uma bactéria Gram-negativa em forma de bastão e classificada como membro da família *Enterobacteriaceae* dentro da classe Gammaproteobacteria, sendo uma das bactérias mais bem estudadas no meio científico. *E. coli* pode crescer rapidamente em condições ideais de crescimento, replicando em aproximadamente 20 minutos. Muitos sistemas de manipulação de genes foram desenvolvidos usando *E. coli* como a bactéria hospedeira, produzindo inúmeras enzimas e outros produtos industriais. A análise de sequência de genoma de *E. coli* foi relatada pela primeira vez em 1997. Desde então, mais de 4800 genomas de *E. coli* foram sequenciados (TENAILLON *et al.*, 2016).

Salmonella spp. são uma bactéria Gram-negativa, com formato de bastonetes e sua locomoção se dá por meio de flagelos que estão por toda célula bacteriana. Quando esta bactéria invade, ela causa danos ao organismo na mucosa do intestino, causando diarreia e febre (DOMINGOS *et al.*, 2015). A resistência aos antibióticos em *Salmonella* tem aumentado, resultando no surgimento de cepas multirresistentes, como a *S. typhimurium* DT104 (FORSYTHE, 2013).

O gênero *Bacillus* compreende patógenos extracelulares e é caracterizado pela formação de esporos, tendo duas formas morfológicas: forma esporulada e célula vegetativa. Observa-se uma longa viabilidade de *B. cereus* no ambiente e nos alimentos, juntamente com a sua capacidade de produção de metabólitos patogênicos, tornando uma bactéria de extrema importância médica (REIS, 2012).

Posto isso, a combinação, o aumento da resistência aos antibióticos e os efeitos adversos que essas bactérias podem causar em cada organismo, tornaram as uma preocupação mundial, sendo fundamental a busca por medicamentos naturais de origem marinha.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. MATERIAL

4.1.1. Corais marinhos e isolamento das bactérias

As colônias de bactérias foram isoladas a partir de corais coletados de aquário marinho doméstico em 2019. As amostras dos corais *Xenia Pompom* (Figura 4) e *Green Star Polyps* (Figura 5) chegaram ao laboratório de engenharia bioquímica em *bags* de polietileno com solução salina (3,6% Sal marinho) conforme recomendações do fabricante (Red Sea Salt – Composição – Cálcio, Magnésio, Potássio, Nitrato, Fosfato). Logo em seguida os corais foram submersos em solução salina (3,6% Sal marinho) estéril em diferentes recipientes, onde permaneceram por cerca de 2 minutos. Da solução salina onde os corais permaneceram submersos, foram retirados 100 μ L que foram inoculados em placas de petri contendo meio semissólido A1 (2% glicose, 0,5% peptona, 0,5% extrato de levedura, 2% ágar e 3,6% sal marinho), onde permaneceram por 48 h em BOD a 28 °C. Posteriormente as bactérias isoladas foram devidamente identificadas e armazenadas em geladeira a 6 °C.

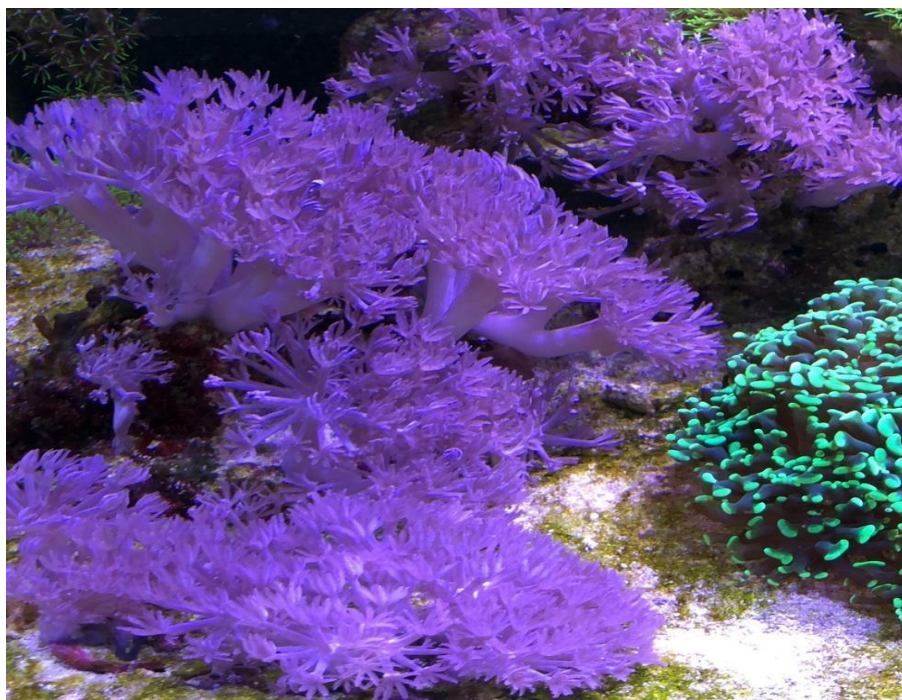


Figura 4: Coral *Xenia Pompom*.



Figura 5: Coral *Green Star Polyps*.

4.1.2. Reativação das bactérias

Para a reativação foram selecionadas as bactérias que apresentaram viabilidade de crescimento em meio de cultura artificial. Portanto as selecionadas foram G13 com codificação para a bactéria referente ao isolamento a partir do coral *Green Satar Polyps* e P2 para o coral *Xenia Pompom*.

Em câmara de fluxo laminar, as bactérias selecionadas foram repicadas em novas placas, contendo meio semissólido A3 (2,8% ágar nutriente, 3,6% sal marinho). As placas inoculadas foram mantidas em BOD a 28 °C por 24 h.

4.2. MÉTODOS

Para o desenvolvimento desta pesquisa foram executados os procedimentos que estão detalhados na Figura 6, que representa o fluxograma da metodologia utilizada.

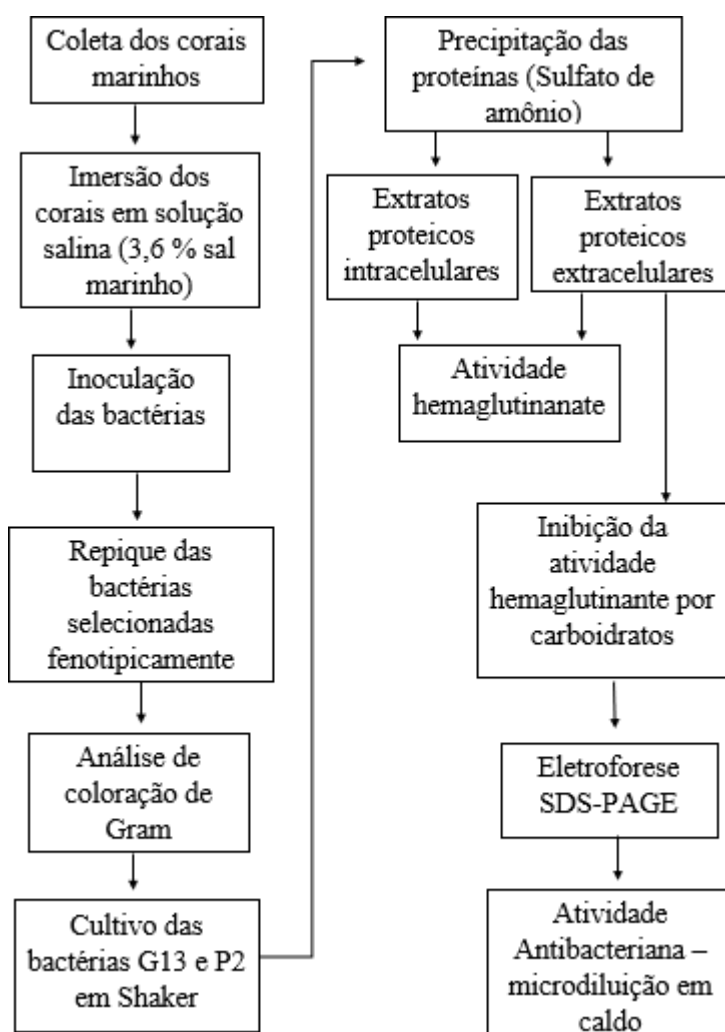


Figura 6: Fluxograma da metodologia desenvolvida para avaliação da atividade hemaglutinante e antibacteriana dos extratos proteicos intracelulares e extracelulares das bactérias marinhas.

4.2.1. Cultivo das bactérias G13 e P2

O cultivo foi realizado por 72h com dois meios à base de ágar (2% glicose, 0,5% peptona, 0,5% extrato de levedura e 3,6% sal marinho) e (1% amido solúvel, 0,4% extrato de levedura, 0,2% peptona e 3,6% sal marinho, suplementado com 10 mL de soluções de $0,5 \text{ g.L}^{-1} \text{ CaCO}_3$, $8,0 \text{ g.L}^{-1} \text{ Fe}_2(\text{SO}_4)_3$ e $20,0 \text{ g.L}^{-1} \text{ KBr}$). Dessa forma, frascos contendo 50 mL de cada meio líquido foram inoculados com as respectivas bactérias e mantidos a temperatura de $28 \text{ }^\circ\text{C}$ sob agitação de 150 rpm.

4.2.2. Preparação dos extratos proteicos

4.2.2.1. Sobrenadante do cultivo das bactérias

Os extratos proteicos foram preparados a partir da separação da biomassa bacteriana por centrifugação de 20 minutos a 3500 rpm, em que o meio líquido resultante do crescimento das bactérias foi utilizado para a precipitação das proteínas, realizando a adição de sulfato de amônio ((NH₄)₂SO₄) para uma saturação de 60%. Em seguida foi realizada a diálise por três horas com troca da água destilada a cada hora, obtendo assim os extratos extracelulares, conforme Tabela 3.

4.2.2.2. Biomassa do cultivo das bactérias

Para a biomassa bacteriana foi adicionado uma solução salina (0,15 M NaCl) e conservada em freezer (- 15 °C) por 48 h. Posteriormente, foi utilizado a enzima zimoliase para degradação da parede celular, adicionado 3,8% de zimoliase nas amostras e incubando-as a 37 °C por 30 minutos, sob agitação de 150 rpm. Em seguida as amostras foram centrifugadas por 5 minutos a 2000 rpm, e o volume líquido remanescente foi utilizado para a produção dos extratos proteicos, seguindo a mesma saturação de 60% e também submetidos a diálise por três horas. Desse modo, adquirindo os extratos intracelulares conforme Tabela 3.

Tabela 3: Extratos proteicos intracelulares e extracelulares das bactérias P2 e G13.

Extratos proteicos	
Intracelulares	Extracelulares
P2 I1	E1 P2
P2 I2	E2 P2
G13 I1	E1 G13
G13 I2	E2 G13

4.2.3. Análise de Gram nas bactérias G13 e P2

As bactérias isoladas G13 e P2, foram classificadas pela coloração de Gram, utilizando o método de Hucker (SILVA, 2017). O conjunto para coloração de Gram empregado para as análises, é da marca Laborclin produtos para laboratórios Ltda e, foi doado pela empresa Kraft Heinz Company – Nova Goiás.

4.2.4. Atividade hemaglutinante

A atividade hemaglutinante foi avaliada em microplacas de 96 poços com fundo em U. As detecções da presença de proteínas hemaglutinantes foram feitas com suspensão de hemácias comerciais dos tipos sanguíneos A, B e O, juntamente com os extratos proteicos foram incubados com solução salina (0,15 M NaCl) na proporção 1:1 por 30 minutos a 37 °C. Em seguida foram adicionados 50 µL suspensão de hemácias 2% (v/v) e novamente incubados por 45 minutos a 37 °C. Para controle negativo foi utilizado solução salina (0,15 M NaCl) de acordo com Farias *et al.*, (2021) Adaptado. A atividade hemaglutinante pode ser verificada pela aglutinação completa dos eritrócitos (Figura 7).



Figura 7: Tipos de aglutinação.

Fonte: (Castiglioni e Guillo, 2020).

4.2.4.1. Inibição da atividade hemaglutinante por carboidratos

As detecções de inibição, foram feitas com suspensão de hemácias comerciais dos tipos sanguíneos A, B e O, juntamente com os extratos proteicos que foram incubados com diferentes soluções de carboidratos (galactose, frutose, maltose, glicose, xilose, rhaminose e sacarose) na concentração de 0,15 M, na proporção 1:1 por 30 minutos a 37 °C. Em seguida foram adicionados 50 µL suspensão de hemácias e novamente incubados por 45 minutos a 37 °C. Para controle negativo foram utilizados solução salina (0,15 M NaCl) e as soluções dos carboidratos. A inibição da atividade hemaglutinante pode ser representada pela imagem sem aglutinação dos eritrócitos (Figura 7).

4.2.5. Eletroforese SDS-PAGE

Os extratos proteicos intracelulares e extracelulares obtidos das fermentações bacterianas foram utilizados para a caracterização das proteínas, pelo método da eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de dodecil sulfato de sódio foi conduzida segundo descrito por (LAEMMLI, 1970).

A análise consiste em dois géis, onde o gel de aplicação foi preparado na concentração de 3,5% de poliacrilamida em tampão Tris-HCl 0,5M, pH 6,8 e SDS a 1%, enquanto o gel de separação foi preparado na concentração de 12 % de poliacrilamida em tampão Tris-HCl 3M, pH 8,8 e SDS a 1%. Na verificação da massa molecular foram utilizadas proteínas padrões de massa conhecida do marcador S2600 (SINAPSE INC2). As massas das proteínas padrões, após a migração no gel, foram comparadas com a migração dos extratos proteicos, obtendo uma estimativa da massa molecular, os géis foram revelados em nitrato de prata (AgNO₃).

4.2.6. Atividade Antibacteriana

4.2.6.1. Micro-organismos

Foram utilizados os seguintes micro-organismos alvo: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Bacillus cereus* ATCC 10876, *Salmonella typhimurium* ATCC 14028 e *Enterococcus faecalis* ATCC 29212. Estas foram adquiridas do Centro de Pesquisa em Alimentos (CPA) da UFG.

Ademais, foi utilizada a bactéria *Escherichia coli*, da linhagem DH5- α , genótipo: endA1 recA1 hsdR17 supE44 gyrA96 thi-1 relA1 Δ lacU169 (ϕ 80lacZ Δ M15) Tetr Δ (mcrA)183 Δ (mcrCB-hsdSMR-mrr)173 (Sambrook e Russel, 2001), obtida do Laboratório de Biotecnologia de Fungos – ICB II.

4.2.6.2. Manutenção das cepas

O meio semissólido (0,5 % extrato de carne, 03 % peptona e 1,5 % ágar) foi utilizado para a manutenção da cultura de *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Salmonella typhimurium*, *Enterococcus faecalis* e *Escherichia coli*.

4.2.6.3. Padronização da suspensão bacteriana

A partir de uma cultura estoque, as bactérias foram repicadas em placas. As placas foram incubadas a 30 °C por 24 h para *Bacillus cereus* e, a 37 °C por 24 h para *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhimurium*, *Enterococcus faecalis* e *Escherichia coli*. Em fluxo laminar, com o auxílio de uma *swab* estéril a cultura bacteriana foi adicionada a um tubo contendo solução salina estéril (0,85% NaCl). A turbidez bacteriana foi ajustada conforme McFarland na escala de 0,5 em espectrofotômetro a 625 nm, então foi realizada uma diluição 1:10, obtendo-se uma suspensão de $1,5 \times 10^7$ UFC.mL⁻¹.

4.2.6.4. Determinação da Concentração Mínima Inibitória (CMI) pelo método de microdiluição em caldo

O teste de microdiluição em caldo foi realizado de acordo com a metodologia descrita pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2012), para bactérias aeróbias, com modificações.

Para o preparo das amostras, os extratos foram concentrados em estufa a vácuo, a uma temperatura máxima de 40 °C. Após seco, pesou-se 20 mg dos extratos proteicos, e adicionou 1 mL de dimetilsulfóxido (DMSO) para solubilização, em seguida adicionou 9 mL de caldo Mueller Hinton (CMH).

Os ensaios foram realizados em microplacas de 96 poços de fundo “U”. Realizou-se diluições seriada, obtendo as concentrações finais dos extratos de 1000, 500, 250, 125, 62,5 e 31,25 µg.mL⁻¹. Adicionalmente, foram distribuídos 10 µL da suspensão bacteriana de $1,5 \times 10^7$ UFC.mL⁻¹, em triplicata (Figura 8).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												

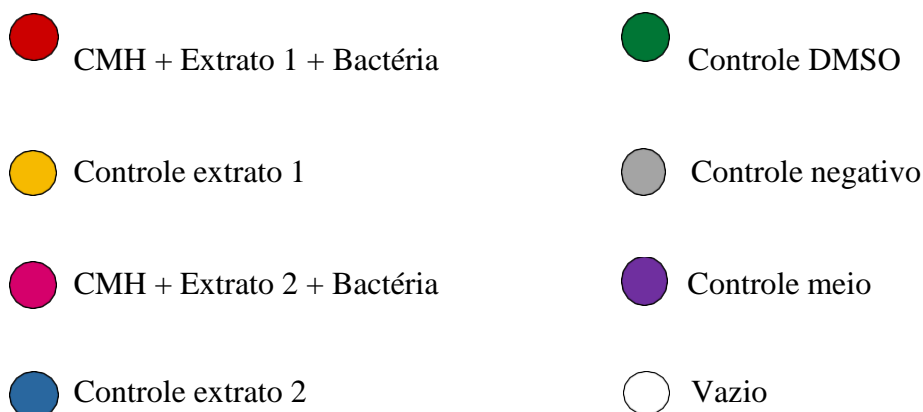


Figura 8: Esquema da microplaca no ensaio de determinação CMI.

5.2.6.5. Controles

O controle dos extratos foi realizado em triplicata para cada extrato (Figura 8). Para tal, foram realizadas diluições seriadas das amostras acrescidas ao CMH, sem a presença do inóculo.

Para avaliar a interferência do solvente empregado na diluição dos extratos, quanto à toxicidade e capacidade de inibir o crescimento microbiano, foi realizado o controle de DMSO. Desta forma, adicionou-se DMSO a 1% ao CMH. Em seguida, foram realizadas diluições seriadas e acrescentou-se o inóculo bacteriano.

Para avaliar a viabilidade dos micro-organismos utilizados, foi adicionado inóculo ao caldo, mas não amostra, sendo o controle negativo. Para verificar a esterilidade do meio, acrescentou-se 200 µL de CMH, como controle do meio.

4.2.6.6. Avaliação da atividade antibacteriana

As microplacas foram incubadas a 30 °C por 24 h para *Bacillus cereus* e a 37 °C por 24 h para *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhimurium*, *Enterococcus faecalis* e *Escherichia coli*. A inibição do crescimento bacteriano foi verificada por espectrofotometria no comprimento de onda de 625 nm, utilizando espectrofotômetro (Lambda 45 da Perkin Elmer UV - Visível).

A inibição do crescimento bacteriano é evidenciada pela ausência de crescimento no meio, sendo a concentração inibitória mínima a menor concentração do extrato capaz de inibir 90% do crescimento das cepas (HORNER *et al.*, 2008). Em relação à classificação da atividade antibacteriana, consideraram-se os seguintes critérios apresentados na Tabela 4.

Tabela 4: Classificação da atividade antibacteriana.

Atividade antibacteriana	CMI µg.mL ⁻¹
Boa	<100
Moderada	100-499
Fraca	500-1000
Inativo	>1000

Fonte: (HOLETZ *et al.*, 2002).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. ISOLAMENTO DAS COLÔNIAS DE BACTÉRIAS ASSOCIADAS AOS CORAIS

Nesse trabalho foi realizado o isolamento das colônias de bactérias a partir da superfície dos corais marinhos. Ao todo, foram isoladas 18 bactérias, sendo nove colônias provenientes do coral *Xenia Pompon* (Figura 9) e nove do coral *Green Star Polyps* (Figura 10). Posteriormente essas colônias de bactérias foram codificadas conforme apresentado na Tabela 5.

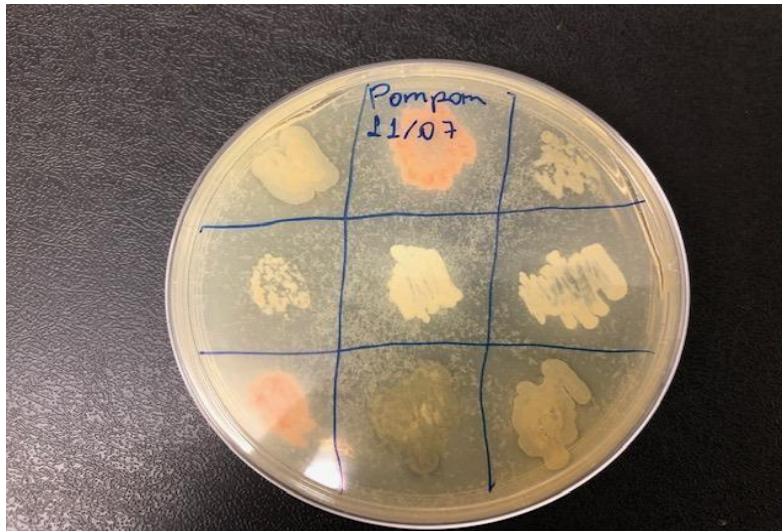


Figura 9: Colônias de bactérias isoladas a partir do coral *Xenia Pompon*.



Figura 10: Colônias de bactérias isoladas a partir do coral *Green Star Polyps*.

Tabela 5: Codificação das colônias de bactérias isoladas dos corais *Xenia Pompom* e *Green Star Polyps*.

Corais	
<i>Xenia Pompom</i>	<i>Green Star Polyps</i>
Bactérias isoladas	
P1	G10
P2	G11
P3	G12
P4	G13
P5	G14
P6	G15
P7	G16
P8	G17
P9	G18

As colônias de bactérias P2 e G13 foram selecionadas para o cultivo em dois meios de crescimento diferentes para obtenção dos extratos brutos, posteriormente os extratos proteicos deram continuidade na avaliação da atividade hemaglutinante e antibacteriana. O processo de seleção dessas bactérias foi feito avaliando a viabilidade do crescimento em meio de cultura artificial, e também pelas características fenotípicas, tais como, cor, aspecto e tamanho.

Colônias de bactérias assim como essas encontradas nesses trabalho, quando em ambientes naturais, estão constantemente interagindo com diferentes comunidades microbianas através de sinalizações físicas e químicas que desempenham um papel importante na regulação da estrutura e da sobrevivência da comunidade marinha (PANDE; KOST, 2017).

5.2. MORFOLOGIA DAS BACTÉRIAS G13 E P2

As bactérias G13 e P2 foram caracterizadas na coloração de Gram, sendo identificadas como pertencentes ao grupo das gram-positivas, apresentando morfologia bacteriana de cocos, como visualizado em microscópio, os arranjos das células são apresentados nas Figuras 11 e 12.



Figura 11: Morfologia da bactéria G13.

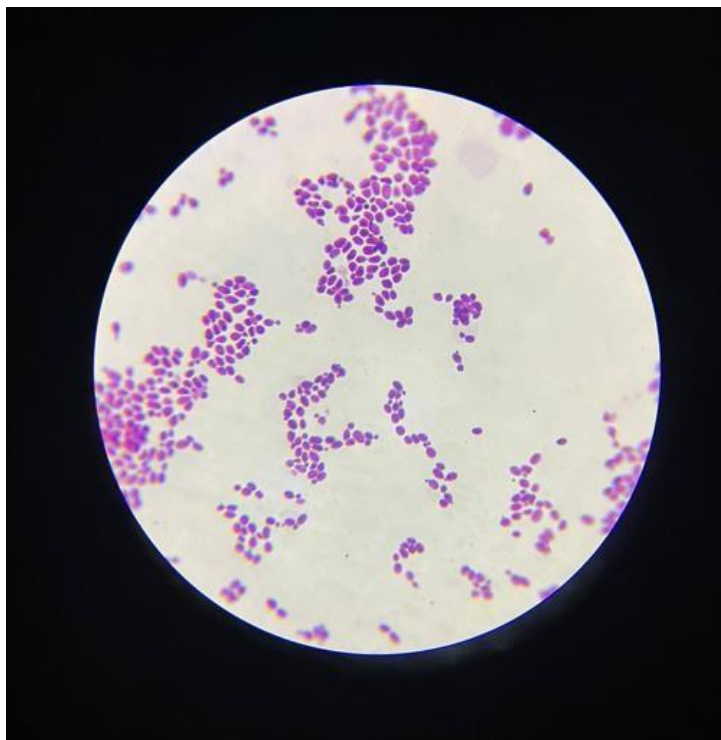
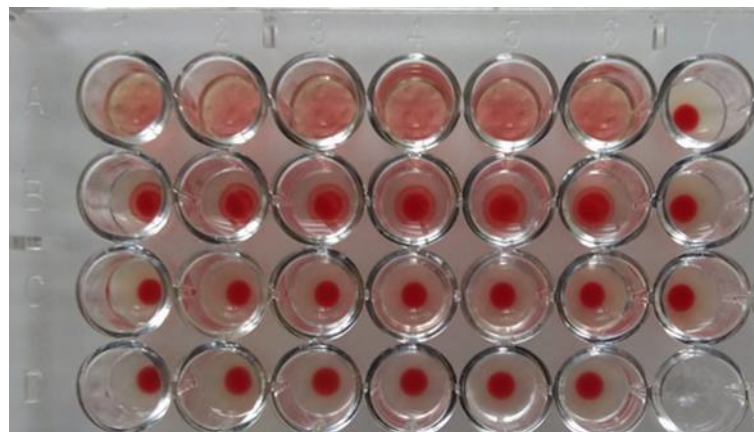


Figura 12: Morfologia da bactéria P2.

5.3. ATIVIDADE HEMAGLUTINANTE DOS EXTRATOS PROTEICOS

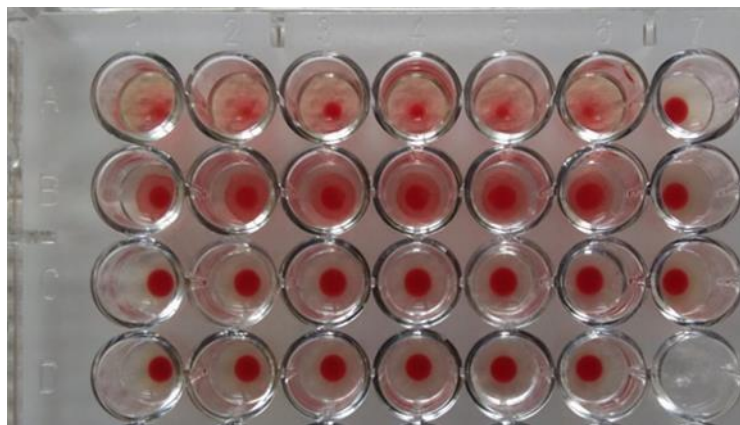
Proteínas podem ser detectadas através de ensaios de hemaglutinação, por promoverem a formação de uma malha de aglutinação ao se ligarem a açúcares presentes na superfície dos eritrócitos, essas proteínas vão possuir diferentes graus de afinidade a diferentes tipos sanguíneos, podendo se ligar a um tipo sanguíneo e a outro não, onde apresentaram mecanismos de ação para diferentes carboidratos.

Alguns extratos proteicos apresentaram atividade hemaglutinante, na presença de suspensão de hemácias comerciais para os tipos sanguíneos A, B e O. As Figuras 13 e 14 apresentam a atividade hemaglutinante dos extratos proteicos intracelulares G13 I1, P2 I1, G13 I2, P2 I2, e extracelulares E1 G13, E1 P2, E2 G13 e E2 P2 na presença dos três tipos sanguíneos (A, B e O).



	1 (A)	2 (A)	3 (B)	4 (B)	5 (O)	6 (O)	7 Controle
A	E1 G13 + NaCl 0,15M						NaCl 0,15 M (A)
B	E2 G13 + NaCl 0,15 M						NaCl 0,15 M (B)
C	G13 I1 + NaCl 0,15 M						NaCl 0,15 M (O)
D	G13 I2 + NaCl 0,15 M						

Figura 13: Atividade hemaglutinante dos extratos proteicos intracelulares e extracelulares G13.



	1 (A)	2 (A)	3 (B)	4 (B)	5 (O)	6 (O)	7 Controle
A	E1 P2 + NaCl 0,15 M						NaCl 0,15 M (A)
B	E2 P2 + NaCl 0,15 M						NaCl 0,15 M (B)
C	P2 II + NaCl 0,15 M						NaCl 0,15 M (O)
D	P2 I2 + NaCl 0,15 M						

Figura 14: Atividade hemaglutinante dos extratos proteicos intracelulares e extracelulares P2.

Os extratos proteicos que apresentaram atividade hemaglutinante foram os seguintes, E1 G13, E2 G13, E1 P2 e E2 P2, portanto, somente os extratos extracelulares apresentaram atividade hemaglutinante. A atividade hemaglutinante pode indicar a existência de proteínas com capacidade de formar a malha celular com os carboidratos de superfície dos diferentes tipos sanguíneos estudados. Tais proteínas tanto extraídas de micro-organismos, de animais ou de fontes de vegetais, podem apresentar potencial biotecnológico para diferentes tipos de atividades biológicas, tais como, antifúngica, inseticida, antitumoral e antibacteriana.

Souza (2018), obteve em seu trabalho um extrato proteico da esponja marinha *Chondrilla caribensis*, no qual apresentou atividade hemaglutinante, e a lectina purificada (CCL II) também mostrou padrão de aglutinação semelhante ao extrato proteico, um potencial para diversos estudos biotecnológicos, bem como a atividade antibacteriana.

Desse modo, pode-se inferir que a substância capaz de produzir hemaglutinação é uma proteína de ligação provavelmente do tipo lectina. No entanto, ensaios de caracterização das frações proteicas serão necessários para confirmar estes resultados. As lectinas constituem um grupo heterogêneo de proteínas, estrutural e funcionalmente, apresentando diversas atividades biológicas, tais como: inseticida, anti-inflamatória, antitumoral, imunomoduladora e antimicrobiana (BRITO *et al.*, 2017).

Na área farmacêutica, as lectinas mais bem estudadas são utilizadas como ferramenta no direcionamento de fármacos, por meio do encapsulamento dessas drogas em lipossomas conjugados, são as lectinas ligadoras de manose e glicoproteínas (PRADELLA *et al.*, 2018). A

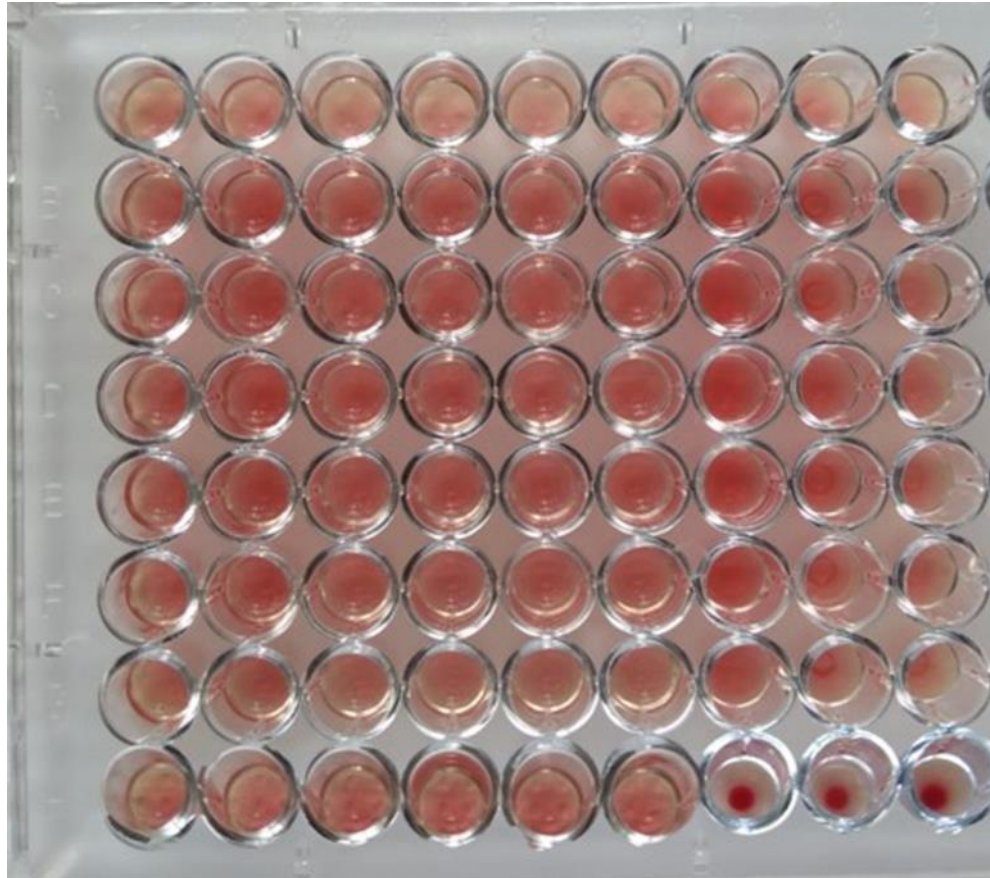
interação de lectinas com glicoconjugados e polissacarídeos presentes na superfície celular de micro-organismos pode desencadear uma série de respostas, resultando na inibição do crescimento e morte do micro-organismo (PROCÓPIO *et al.*, 2017). Em vista disso, pesquisas têm avançado no processo de purificação e caracterização de extratos proteicos.

Os extratos proteicos intracelulares que não apresentaram atividade hemaglutinante se assemelham ao mesmo resultado encontrado por SILVA, (2019) quando trabalharam com extratos vegetais submetidos a precipitação das proteínas com sulfato de amônio.

Após a constatação da atividade hemaglutinante dos extratos proteicos extracelulares (E1 G13, E2 G13, E1 P2 e E2 P2) com os tipos sanguíneos (A, B e O), a inibição da atividade hemaglutinante por carboidratos é necessária para que seja possível a identificação das proteínas responsáveis por tal hemaglutinação com os carboidratos presentes na superfície dos eritrócitos.

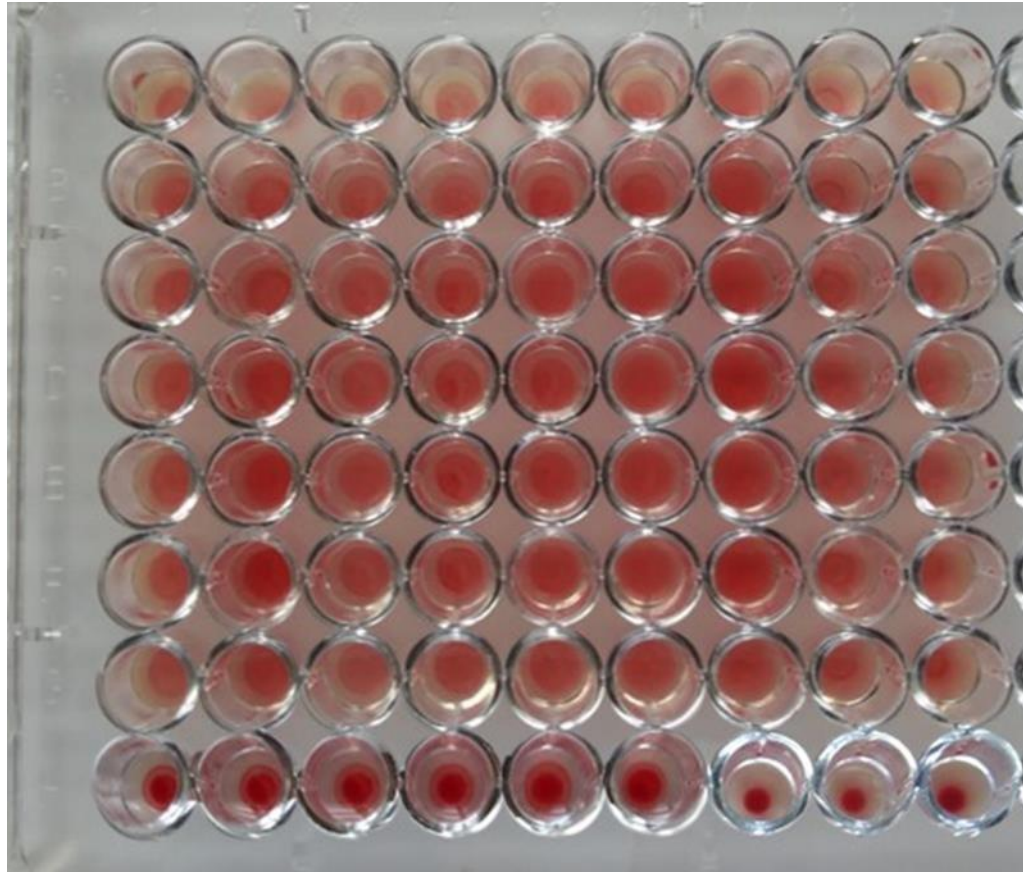
5.4.1 Inibição da atividade hemaglutinante por carboidratos para os extratos proteicos extracelulares

Para comprovação que o agente hemaglutinante são lectinas, é necessário que a atividade hemaglutinante (AH) seja inibida pela adição de carboidratos livres, pois os carboidratos livres irão competir com os carboidratos presentes, fazendo com que as lectinas não consigam se ligar aos carboidratos dos eritrócitos, com isso, não haverá formação da malha celular. Esse método atua como uma contra prova, a fim de identificar as proteínas presentes nos extratos proteicos. As Figuras 15 ao 18 apresentam os resultados de inibição da atividade hemaglutinante dos extratos por carboidratos. Portanto, a capacidade das lectinas de mediar interações de reticulação com carboidratos presentes na membrana de micro-organismos é confirmada por ensaios de aglutinação (VELAYUTHAME, *et al.*, 2017).



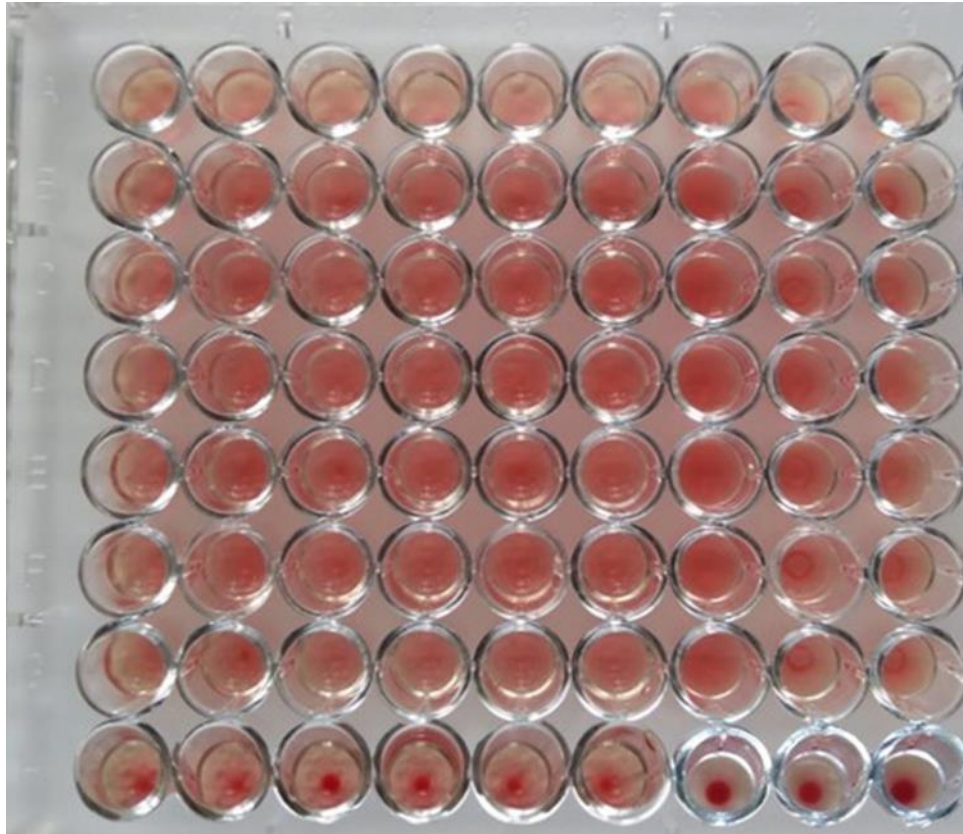
	1 (A)	2 (A)	3 (B)	4 (B)	5 (O)	6 (O)	7 C (A)	8 C (B)	9 C (O)
A	Galactose + E1 G13						Galactose		
B	Fructose + E1 13						Fructose		
C	Maltose + E1 G13						Maltose		
D	Glicose + E1 G13						Glicose		
E	Xilose + E1 G13						Xilose		
F	Rhaminose + E1 G13						Rhaminose		
G	Sacarose + E1 G13						Sacarose		
H	E1 G13 + NaCl 0,15 M						NaCl 0,15 M		

Figura 15: Inibição da atividade hemaglutinante para o extrato extracelular E1 G13.



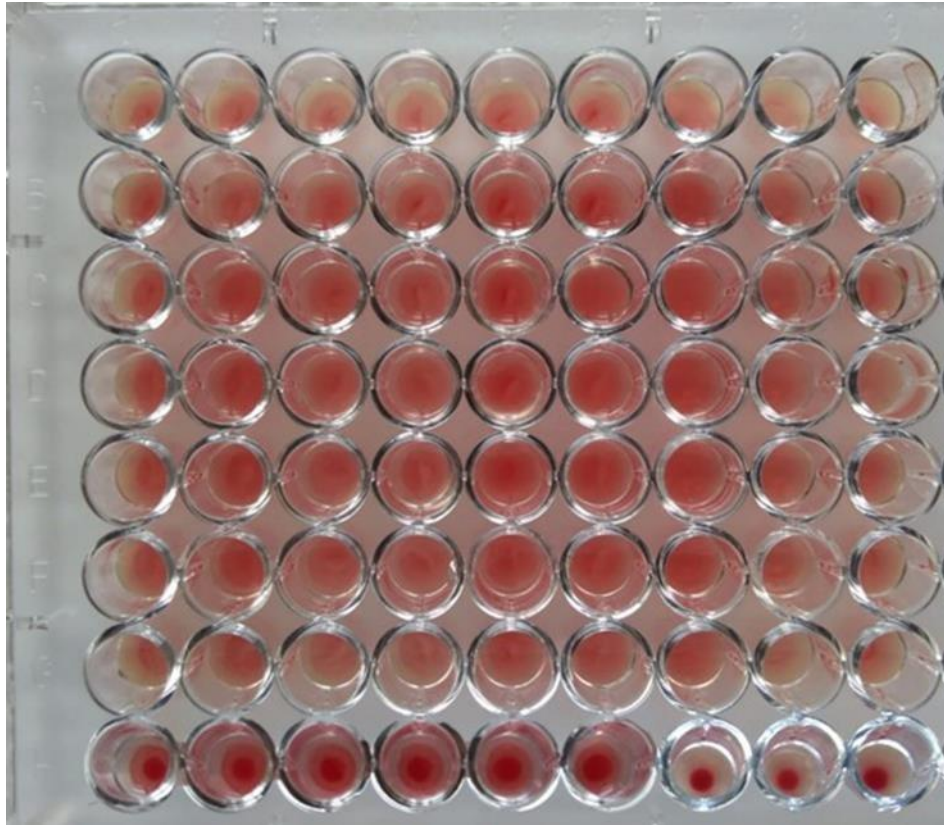
	1 (A)	2 (A)	3 (B)	4 (B)	5 (O)	6 (O)	7 C (A)	8 C (B)	9 C (O)
A	Galactose + E2 G13						Galactose		
B	Fructose + E2 G13						Fructose		
C	Maltose + E2 G13						Maltose		
D	Glicose + E2 G13						Glicose		
E	Xilose + E2 G13						Xilose		
F	Rhaminose + E2 G13						Rhaminose		
G	Sacarose + E2 G13						Sacarose		
H	E2 G13 + NaCl 0,15 M						NaCl 0,15 M		

Figura 16: Inibição da atividade hemaglutinante para o extrato extracelular E2 G13.



	1 (A)	2 (A)	3 (B)	4 (B)	5 (O)	6 (O)	7 C (A)	8 C (B)	9 C (O)
A	Galactose + E1 P2						Galactose		
B	Fructose + E1 P2						Fructose		
C	Maltose + E1 P2						Maltose		
D	Glicose + E1 P2						Glicose		
E	Xilose + E1 P2						Xilose		
F	Rhaminose + E1 P2						Rhaminose		
G	Sacarose + E1 P2						Sacarose		
H	E1 P2 + NaCl 0,15 M						NaCl 0,15 M		

Figura 17: Inibição da atividade hemaglutinante para o extrato extracelular E1 P2.



	1 (A)	2 (A)	3 (B)	4 (B)	5 (O)	6 (O)	7 C (A)	8 C (B)	9 C (O)
A	Galactose + E2 P2						Galactose		
B	Frutose + E2 P2						Frutose		
C	Maltose + E2 P2						Maltose		
D	Glicose + E2 P2						Glicose		
E	Xilose + E2 P2						Xilose		
F	Rhaminose + E2 P2						Rhaminose		
G	Sacarose + E2 P2						Sacarose		
H	E2 P2 + NaCl 0,15 M						NaCl 0,15 M		

Figura 18: Inibição da atividade hemaglutinante para o extrato extracelular E2 P2.

A inibição da AH ocorre quando a afinidade da proteína, do grupo das lectinas com os carboidratos livres em solução é maior que sua afinidade pelos carboidratos da superfície dos eritrócitos. Para esses ensaios não houve inibição da atividade hemaglutinante para os sete tipos de carboidratos em solução testados, foram eles, Galactose, Frutose, Maltose, Glicose, Xilose, Rhaminose e Sacarose, pode se afirmar que não houve inibição por conta da formação da malha celular, configurando atividade hemaglutinante com os quatro extratos extracelulares. Podendo ser observado essa aglutinação na Figura 15 para o extrato proteico E1 G13; na Figura 16 para o extrato E2 G13; na Figura 17 para o extrato E1 P2 e na Figura 18 para o extrato E2 P2.

A partir desse resultado para a inibição da atividade hemaglutinante com os carboidratos testados, ainda não foi possível dizer que as proteínas responsáveis por tal atividade hemaglutinante são do grupo das lectinas, por isso, as proteínas presentes nesses extratos provavelmente iram se ligar a outros tipos de carboidratos ou proteínas, como foi o caso do estudo de SILVA (2019), para o extrato vegetal da lectina das folhas de *Portulaca elatior* (PeLL), onde a atividade hemaglutinante foi inibida principalmente por albumina sérica bovina.

5.4. OBTENÇÃO E ELETROFORESE SDS-PAGE DAS PROTEÍNAS OBTIDAS A PARTIR DOS EXTRATOS PROTEICOS EXTRACELULARES

Os extratos proteicos foram obtidos a uma saturação de 60% com sulfato de amônio ((NH₄)₂SO₄), esse método foi feito para separar as proteínas, e possivelmente, promover purificação parcial dos extratos. Para os extratos proteicos, tanto extracelulares quanto intracelulares foi realizado a eletroforese em SDS-PAGE, onde podemos observar o perfil das principais proteínas presentes nos extratos proteicos e também a estimativa do peso molecular. Na Figura 19 são apresentados os perfis de tamanho das proteínas, para os extratos extracelulares (E1 G13, E1 P2, E2 G13 e E2 P2).

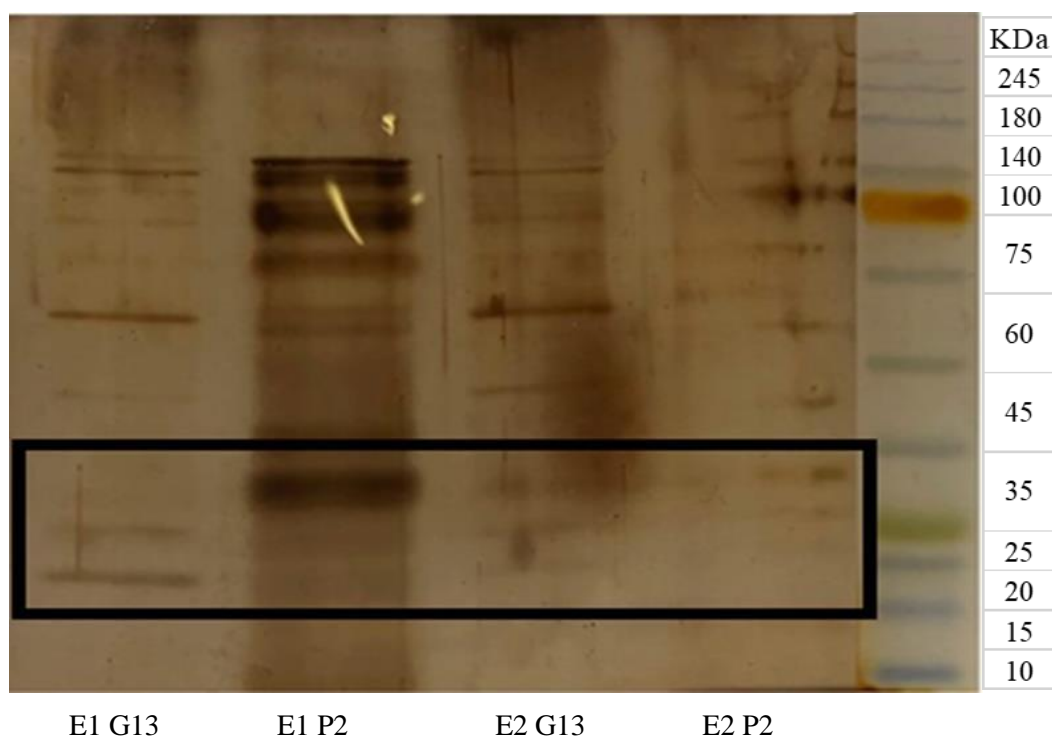


Figura 19: SDS-PAGE dos extratos proteicos E2 P2, E2 G13, E1 P2, E1 G13.

Os extratos proteicos extracelulares, apresentaram pesos moleculares na faixa de tamanho para proteínas que podem apresentar atividade biológica, que variaram de 18 a 30 KDa, (CHAVES, 2018); (DUARTE, 2018); (SOUSA, 2018); mencionam que proteínas nessa faixa de tamanho comumente podem apresentar atividade biológica. Sendo assim, podemos alegar que os extratos extracelulares possuem potencial para atividade biológica, tornando assim a investigação desses extratos consideravelmente importante, para avaliar qual atividade biológica podem conter.

Considerando a Figura 19, os extratos E2 G13 e E1 G13 verificamos não somente as bandas como também uma similaridade dos pesos moleculares que esses extratos apresentam, isso pode ser justificado pelo fato de ser a mesma colônia de bactéria marinha, diferenciando apenas o meio de crescimento.

Alguns extratos proteicos com proteínas que apresentam pesos molecular em faixas menores (18-30 KDa) na eletroforese SDS-PAGE, podem também apresentar atividade antimicrobiana, assim como no trabalho desenvolvido por SILVA, 2019 que ao estudar a purificação, caracterização e avaliação de atividade antimicrobiana de lectina de folhas de *Portulaca elatior*, o extrato proteico apresentou uma única banda de peso molecular de aproximadamente 20KDa.

CHAVES (2018), em seu estudo com as lectinas das algas marinhas vermelhas *Meristiella echinocarpa* (MeL) e *Solieria filiformis* (SfL) encontrou massas estimadas de MeL e SfL por SDS-PAGE foram de 30 kDa e 28 kDa, respectivamente. Valores esses que são próximos ao encontrado para os extratos EI P2, E2 G13, E2 P2, conforme foram estimados na Tabela 6.

SILVA *et al.*, (2021), encontraram para o extrato *Portulaca elatior leaf lectin* (PeLL), quando avaliado por SDS-PAGE uma única banda de 20 kDa, esse resultado demonstra a homogeneidade da preparação e confirmam o isolamento de PeLL. Podendo ser comparado com os extratos proteicos E1 G13 e E2 G13, por terem apresentado bandas com valores próximo a esse, no entanto estimadas, sendo de 18 e 24 KDa.

Tabela 6: Massas moleculares dos extratos proteicos extracelulares.

Extrato proteicos	Massa molecular (KDa)
E1 G13	18 e 24
E1 P2	30
E2 G13	18, 24 e 30
E2 P2	28 e 30

5.5. ATIVIDADE ANTIBACTERIANA NOS EXTRATOS PROTEICOS EXTRACELULARES

Os ensaios da atividade antibacteriana dos extratos proteicos foram realizados frente a cinco cepas testadas, são elas, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Salmonella typhimurium* ATCC 14028, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Bacillus cereus* ATCC 10876 e *Escherichia coli*. No entanto na inibição do crescimento bacteriano ocorreu para: *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 e *Escherichia coli* (Tabela 7).

Tabela 7: Concentração mínima inibitória dos extratos proteicos extracelulares.

Extratos	CIM $\mu\text{g.mL}^{-1}$				
	Bactérias				
	<i>E. faecalis</i>	<i>S. aureus</i>	<i>B.cereus</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. typhimurium</i>
E1 G13	31,25	>1000	>1000	1000	>1000
E1 P2	>1000	>1000	>1000	1000	>1000
E2 G13	31,25	>1000	>1000	1000	>1000
E2 P2	1000	>1000	>1000	>1000	>1000

A partir da Tabela 7 podemos observar que os extratos E1 G13, E2 G13 e E1 P2 apresentaram uma mesma concentração de inibição para um mesmo micro-organismo sendo de $1000 \mu\text{g.mL}^{-1}$, para a *Escherichia coli*. Já para *E. faecalis* a concentração variou entre os extratos, sendo de $31,25 \mu\text{g.mL}^{-1}$ para E1 G13 e E2 G13 e $1000 \mu\text{g.mL}^{-1}$ para E2 P2. *E. faecalis* é uma bactéria gram-positiva, o que comprova dados de literatura em que as gram-positivas são mais susceptíveis a inibição devida sua estrutura de membrana, uma vez que bactérias gram-negativas possuem paredes mais complexas, dificultando que os agentes antibacterianos adentrem seu interior. Os princípios ativos responsáveis por tal atividade ainda não estão elucidados. No entanto os quatro extratos extracelulares que apresentaram atividade antibacteriana (E1 G13, E1 P2, E2 G13 e E2 P2), são promissores agentes antibacterianos de origem natural marinha.

Enterococcus faecalis e *E. coli* são importantes patógenos associados aos cuidados de saúde e as principais causas de infecção por resistência a medicamentos. Por isso a necessidade de desenvolver novos agentes com potencial antibacteriano, a fim de, possibilitar a descoberta de novos produtos com diferentes princípios ativos.

Existem trabalhos que também utilizaram várias bactérias para investigar extratos quanto a atividade antibacteriana, assim como (YANG *et al.*, 2020) que obtiveram caldos de cultura a partir de *Streptomyces lusitanus* também extraídos com EtOAc, resultando em três compostos. Os três compostos exibiram inibição do crescimento bacteriano contra as cepas, *Enterococcus faecalis* CCARM 5172 (CMI: 6,25-50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$); *Escherichia coli* CCARM 1009 (CMI: 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) *Salmonella typhimurium* CCARM 8250 (CMI: 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) *Staphylococcus aureus* CCARM 3090 (CMI: 6,25 – 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$). Nesse trabalho, fizeram um estudo semelhante ao que fizemos por utilizarem os mesmos micro-organismo alvos para análise da atividade antibacteriana. Com relação ao resultado podemos comparar com *Enterococcus faecalis*, que em nosso estudo apresentou concentração de inibição do crescimento bacteriano de 31,25 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, para dois (E1 G13 e E3 G13) dos quatro extratos testado, similar quando comparado ao intervalo encontrado por Yang e colaboradores para essa mesma bactéria.

Resultados equivalentes foram encontrados por THI *et al.*, (2016) que trabalharam com uma suplementação semelhante, utilizando carbonato de cálcio, sulfato de ferro e brometo de potássio no meio líquido para actinomicetos derivados do mar em que os caldos de cultura foram extraídos com acetato de etila. Obtiveram resultados de atividade antibacteriana com concentrações de inibição para o composto 2 em *E.faecalis* ATCC13124 (CMI: 32 $\mu\text{g.mL}^{-1}$), resultado próximo ao nosso estudo, quando comparado com os extratos proteicos E1 G13 e E2 G13.

Trabalhos que também avaliaram a atividade antibacteriana em extratos proteicos, como, SILVA (2016) em avaliação das atividades biológicas do extrato proteico do muco produzido pelo zoantídeo *palythoa caribaeorum* encontrou atividade antibacteriana contra a cepa, *Escherichia coli* ATCC® 25922 (CMI: 250 $\mu\text{g.mL}^{-1}$). Um outro trabalho, também de extratos vegetais obteve atividade antibacteriana. Al-MAMUN (2016) em um estudo com extrato da semente *Ricinus communis*, apresentou uma concentração de inibição de crescimento microbiano de 250 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ para uma cepa de *E. coli*, utilizando o método de concentração mínima inibitória, sendo semelhante ao nosso estudo quando comparado com extratos que obtiveram atividade antibacteriana frente a *E. coli*. No entanto em uma concentração maior dos extratos extracelulares E1 G13, E2 G13 e E1 P2 que inibiram o crescimento bacteriano a uma concentração de 1000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$).

Resultados semelhantes foram observados por (AMARAL, *et al.*, 2020), que em seu estudo do potencial da atividade biológica de actinomicetos contra o fungo *Cryptococcus gattii*. Mostra que *Streptomyces sp.* e *Streptosporangium sp.* que fazem parte do Filo dos Actinomicetos, bactérias gram-positivas, apresentam um grande potencial de produção de

metabólitos com ação antimicrobiana. Assim se assemelham com os resultados encontrados para os extratos proteicos a partir do cultivo das bactérias G13 e P2, que também são do grupo das bactérias gram-positivas, e apresentam extratos proteicos com potencial antibacteriano.

Outros potenciais também são conferidos aos extratos a partir de organismos marinhos, tais como no estudo feito por PINTO *et al.*, (2020), onde descreveram o isolamento e a elucidação estrutural de quatro cromomicinas dextorrotatórias uma classe promissora de compostos anticancerígenos, e de um extrato citotóxico contra linha celular de câncer de cólon produzido por uma bactéria *Streptomyces* isolada de um coral mole, *Palythoa caribaeorum*, coletado na praia de Pedra Rachada, localizada na costa oeste do estado do Ceará.

CARNEIRO *et al.*, (2019) estudaram uma nova lectina de ligação à mucina que foi isolada da esponja marinha *Aplysina fulva*, apresentando efeitos antibiofilme para as seguintes bactérias, *Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis*, e *Escherichia coli*. No SDS PAGE essa lectina apresentou uma banda de aproximadamente 16 KDa. A esponja *Aplysina fulva* foi coletada na praia de Iracema, Fortaleza-CE.

6. CONCLUSÃO

A partir dos resultados apresentados, conclui-se que foi possível isolar as bactérias marinhas (G13 e P2) a partir de corais (*Green Start Polyps e Xenia Pompom*), onde os extratos proteicos extracelulares, apresentaram atividade hemaglutinante para os tipos sanguíneos A, B e O. Os mesmos extratos também apresentaram atividade antibacteriana, em diferentes inibições de crescimento microbiano contra bactérias patogênicas, sendo que os extratos que manifestaram resultados antibacteriano para duas das cinco cepas testadas, foram E1 G13 e E2 G13, portanto apresentaram inibição tanto para as bactéria gram-positiva (*Enterococcus faecalis*) como para bactéria gram-negativa (*Escherichia coli*), variando a concentração mínima inibitória entre (31,25-1000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$). Obtivemos outros dois extratos que também apresentaram atividade antibacteriana, sendo apenas para uma cepa das cinco testadas. O extrato E2 P2 apresentou inibição de crescimento microbiano para cepa *Enterococcus faecalis* (1000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$), e o extrato E1 P2 apresentou inibição de crescimento para a cepa *Escherichia coli* (1000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$). Portanto esses quatro extratos proteicos extracelulares obtiveram hemaglutinação para os três tipos sanguíneos testados e, mostram-se promissores agentes biológicos quanto à atividade antibacteriana. podendo contribuir para a ampliação de produtos naturais de origem marinha.

7. REFERÊNCIAS

- Al-MAMUN, M, A, *et al.*, *Characterization and evaluation of antibacterial and antiproliferative activities of crude protein extracts isolated from the seed of Ricinus communis in Bangladesh*. BMC Complementary and Alternative Medicine, v.16, 2016.
- AMARAL, S dos S, *et al.*, *Potencial da atividade biológica de actinomicetos contra o fungo Cryptococcus gattii*. Interfaces Científica -Saúde e Ambiente v. 8, ed. 2, p. 95-104. 2020.
- BHATTACHARYA, D, *et al.*, *Comparative genomics explains the evolutionary success of reef-forming corals*. Elife, v. 5, 2016
- BIALONSKA, D; ZIAWIONY, J. K. *Aplysinopsinsmarine indol alcalóides: química, bioatividade e significado ecológic*, Mar Drogas, v.7, p.166–183, 2009.
- BRITO, J. S. *et al.*, *Lectin from inflorescences of ornamental crop Alpinia purpurata acts on immune cells to promote Th1 and Th17 responses, nitric oxide release, and lymphocyte activation*. Biomedicine & pharmacotherapy, v. 94, p. 865-872, 2017.
- BLUNT, J. W. *et al. Marine Natural Products*. Nat. Prod. Rep., London, v. 33 p. 382-431, 2016.
- CAMPOS, C, A, *et al.*, *Resistência antimicrobiana em Enterococcus faecalis e Enterococcus faecium isolados de carcaças de frango*. Pesquisa Veterinária Brasileira, Rio de Janeiro, v. 33, n. 5, 575–580. 2013.
- CARNEIRO, R, F, *et al.*, *A new mucin-binding lectin from the marine sponge Aplysina fulva (AFL) exhibits antibiofilm effects*. Archives of Biochemistry and Biophysics, v. 662, p. 169-176. 2019.
- CARROLL, A. R. *et al. Marine natural products*. Natural Product Reports, v. 37, p. 175-223. 2020.
- CASTIGLIONI, G, L.; GUILLO, O, L, A. *Atividade hemaglutinante do extrato aquoso de folhas de Nicotina Tabacum e Adenium obesum e sementes de Artocarpus heterophyllus*. 17º Conpeex, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2020. Disponível em: https://www.youtube.com/watch?v=WeY1_arLadg. Acesso em: 25 nov. 2021.
- CHAVES, R. P. *Caracterização estrutural e potencial biotecnológico de suas lectinas pertencentes a família de lectinas homologadas a Oscillatoria agardhii AGGLUTININ (OAAH)*. Tese (Doutorado em Biotecnologia de Recursos Naturais), Universidade Federal do Ceará, 2018.
- CLSI. *Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests f or Bacteria That Grow Aerobically; Approved St andard—Ninth Edition*. CLSI document M07-A9.Clinical and Laboratory Standards Institute, v.32, n.2, p. 1-88, 2012.

COSTA-LOTUFO, L. V. *et al.*, *Chemical profiling of two congeneric sea mat corals along the Brazilian coast: adaptive and functional patterns*, Chem. Commun., v.54, p.1952-1955, 2018.

CRAGG, G. M., NEWMAN, D. J. *Natural Products as Sources of Anticancer Agents: Current Approaches and perspectives*. Natural Products As Source Of Molecules With Therapeutic Potential, p.309-331, 2018.

DA SILVA, A. B. *et al.*, *Antibacterial Salinaphthoquinones from a Strain of the Bacterium Salinispora arenicola Recovered from the Marine Sediments of St. Peter and St. Paul Archipelago Brazil*. Journal of Natural Products, v. 82, n.7, p.1831–1838, 2019.

DE ALBUQUERQUE, L. P. *et al.*, *Antifungal activity of Microgramma vacciniifolia rhizome lectin on genetically distinct Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici races*. Appl Biochem Biotechnol, v.172, p.1098–1105. 2014.

DOMINGOS, I. *et al.*, *Salmonella spp . – uma revisão*. Faculdade de Ciências Sociais e Agrárias de Itapeva, São Paulo, 2015.

DUARTE, *et al.* *Atividade hemaglutinante do extrato da esponja marinha TETHYA SP*. Encontros Universitários. UFC, Fortaleza, v.3, 2018.

ELLIS, M. W. *et al.*, *Hygiene Strategies to Prevent Methicillin- Resistant Staphylococcus aureus Skin and Soft Tissue Infections : A Cluster-Randomized Controlled Trial Among High-Risk Military Trainees*. Clinical Infectious Diseases v. 58, p. 1540–1548. 2014.

FARIAS, A. A.; DE OLIVEIRA, W. R. .; DA SILVA, E. N. .; REGO, E. J. L. . *Atividade hemaglutinante em sementes de Bauhinia subclavata Benth e Crotalaria spectabilis Roth*. Latin American Journal of Development, v. 3, n. 3, p. 1433–1443, 2021.

FERREIRA, G. R. S., *et al.* *Antimicrobial potential of Alpinia purpurata lectin (ApuL): Growth inhibitory action, synergistic effects in combination with antibiotics, and antibiofilm activity*. Microbial Pathogenesis, v.124, p, 152–162, 2018.

FORSYTHE, S. J. *Microbiologia da segurança dos alimentos*. 2ª ed, Artmed, Porto Alegre, p. 1-620. 2013.

FLORÊNCIO, K. G. D. *Cromomicinas isoladas de Streptomyces sp. bra-384 recuperada do zoantídeo Palythoa caribaeorum induzem morte celular imunogênica em melanoma metastático*. Tese (Doutorado em Farmacologia) – Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará, 2021.

GOGINENI, V. *et al.*, *Role of symbiosis in the discovery of novel antibiotics*. Journal of Antibiotics, v. 73, n. 8, p.490–503. 2020.

HOLETZ, F. B. *et al.* *Screening of some plants used in the Brazilian folk medicine for the treatment of*

infectious diseases. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, v. 97, p. 1027-1031, 2002.

HÖRNER, M. *et al.* *Triazenos e atividade antibacteriana*. Revista Brasileira de Ciências Farmaceuticas, v. 44, n. 3, p. 441–449, 2008.

IÓCA, L. P. *et al.*, *Thinking big about small beings-the (yet) underdeveloped microbial natural products chemistry in Brazil*. Natural Product Reports, v. 31, n. 5, p. 646–675. 2014.

LAEMMLI, U. K. *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4*. Nature, v. 227, n. 5259, p. 680-685, 1970.

LEITE, D. C. de A.; MACHADO, L. F.; ROSADO, A. S.; PEIXOTO, R. S. *A saúde dos nossos recifes: uma questão de equilíbrio*. In: ZILBERBERG (Org.). *Conhecendo os recifes brasileiros*. Rio de Janeiro: Museu Nacional, 2016.

MAYER, A. M. S. *et al.*, *Marine pharmacology in 2012–2013: Marine compounds with antibacterial, antidiabetic, antifungal, anti-inflammatory, antiprotzoal, antituberculosis, and antiviral activities; affecting the immune and nervous systems, and other miscellaneous mechanisms of*. Marine Drugs, v. 15, n. 9, p. 1–61. 2017.

NWEZE, J. A. *et al.*, *Antibiotics development and the potentials of marine-derived compounds to stem the tide of multidrug-resistant pathogenic bacteria, fungi, and protozoa*. Marine Drugs, v. 18, n. 3, p. 145, 2020.

OMS, 2017. *Lista de bactérias para as quais novos antibióticos são urgentemente necessários*. Disponível em: <https://www.who.int/news/item/27-02-2017-who-publishes-list-of-bacteria-for-which-new-antibiotics-are-urgently-needed>. Acesso em: 15 nov, 2021.

PANDE, S.; Kost, C. *Bacterial Unculturability and the Formation of Intercellular Metabolic Networks*. Trends in Microbiology, v. 25, n. 5, p. 349–361. 2017.

PINTO, F. C. *et al.*, *Dextrorotatory Chromomycins from the Marine*. J. Braz. Chem. Soc, v. 31, p.143–152. 2019.

PINTO, F. C. L.; *et al.* *Cromomicinas dextrorrotatórias de Marine Streptomyces sp. Associado a Palythoa caribaeorum*. Journal of the Brazilian Chemical Society, v. 31, n. 1, p.143-152, 2020.

PRADELLA, F. M. *et al.*, *Níveis circulantes da lectina ligadora de manose (MBL) na degeneração macular relacionada à idade*, Arquivos brasileiros de Oftalmologia. v.81, n.2, p 120-124, 2018.

PROCÓPIO, T. F. *et al.*, *CasuL: A new lectin isolated from Calliandra surinamensis leaf pinnulae with cytotoxicity to cancer cells, antimicrobial activity and antibiofilm effect*. International Journal of Biological Macromolecules. v.98, p.419-429, 2017.

- PYE, C. R. *et al.*, *Retrospective analysis of natural products provides insights for future discovery trends*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, v. 114, n. 22, p. 5601–5606, 2017.
- REICHMANN, N.T.; PINHO, M. G. *Role of SCCmec type in resistance to the synergistic activity of oxacillin and ceftiofloxacin in MRSA*. Scientific Reports, v. 7, n. 1, p. 1–9, 2017.
- REIS, A. L. S. *Caracterização genotípica de patogenicidade de Bacillus cereus isolados de produtos lácteos*. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal do Paraná, 2012.
- RODRÍGUEZ, V. *et al.*, *Anthracimycin B, a potent antibiotic against gram-positive bacteria isolated from cultures of the deep-sea actinomycete streptomyces cyaneofuscatus M-169*. Marine Drugs, v. 16, n. 11, 2018.
- SILVA, J. D. F. *et al.*, *Portulaca elatior root contains a trehalose-binding lectin with antibacterial and antifungal activities*. International Journal of Biological Macromolecules. v.126, e.1, p291-297, 2019.
- SILVA, M. S. *Atividades biológicas e perfil proteômico do muco produzido pelo zoantídeo Palythoa caribaeorum*. Dissertação (Mestrado em Saúde Humana e Meio Ambiente), Universidade Federal de Pernambuco, 2016.
- SILVA, N. *et al.* *Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos e água*. São Paulo : Ed. BLUCHER. 5ªed. p.1-560. 2017.
- SILVA, S. P., da Silva, J. D. F., da Costa, C. B. L. *et al.* *Purification, Characterization, and Assessment of Antimicrobial Activity and Toxicity of Portulaca elatior Leaf Lectin (PeLL)*. Probiotics and Antimicrobial Proteins, 2021.
- SILVA, S, P. *Purificação, caracterização e avaliação de atividade antimicrobiana de lectina de folhas de Portulaca elatior*. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) - Universidade Federal de Pernambuco, 2019.
- SOUSA, A. R. D. O. *Purificações e caracterização bioquímica de uma nova lectina da esponja marinha Chondrilla caribensis RÜTZLER, DURAN & PIANTONI, 2007*. TCC (Engenharia de Pesca), Universidade Federal Do Ceará, 2018.
- TENAILLON, O. *et al.*, *Tempo and mode of genome evolution in a 50,000-generation experiment*. Nature, v.536, p.165-170, 2016.
- THI, Q. V. *et al.* *Antimicrobial metabolites from a marine-derived actinomycete in Vietnam's East Sea*. Natural Product Communications, v. 11, n. 1, p. 1934578X1601100116, 2016.
- THOMPSON, F. *et al.* *Biotechnologia marinha*. 2ªed, FRUG, Rio Grande, 2020.

VELAYUTHAM, *et al.*, *Purification, characterization, and analysis of antibacterial activity of a serum lectin from the grub of rhinoceros beetle, Oryctes rhinoceros*. *Process Biochem*, v.53, p.232–244. 2017.

WATERS, A. L. *et al.*, *An analysis of the sponge Acanthostrongylophora igens' microbiome yields an actinomycete that produces the natural product manzamine A*. *Frontiers in Marine Science*, v. 1, n. 54, 2014.

WILKE, D. V. *et al.*, *Anticancer Potential of Compounds from the Brazilian Blue Amazon*. *Planta Med*, v. 87, 2020.

YANG, L. *et al.*, *Antibiotic angucycline derivatives from the deepsea-derived Streptomyces lusitanus*. *Natural Product Research*, v. 34, n. 24, p.3444–3450, 2020.