

**Avaliação da atividade antimicrobiana da esponja marinha
Ectyoplasia ferox de Fernando de Noronha**

**Evaluation of antimicrobial activity of *Ectyoplasia ferox*
marine sponge from Fernando de Noronha**

DOI:10.34117/bjdv6n6-625

Recebimento dos originais: 08/05/2020

Aceitação para publicação: 28/06/2020

Stephanie Montechiari Pereira da Silva

Graduanda em Farmácia

Instituição: Universidade Federal Fluminense

Endereço: Rua Mario Santos Braga, 30 - 24020-140 - Centro - Niterói/RJ

E-mail: stephanie_montechiari@id.uff.br

Thayssa da Silva Ferreira Fagundes

Doutoranda em Química

Instituição: Universidade Federal Fluminense

Endereço: Rua Mario Santos Braga, 30 - 24020-140 - Centro - Niterói/RJ

E-mail: thayssafagundes@id.uff.br

Higor de Andrade Chagas

Graduando em Química

Instituição: Universidade Federal Fluminense

Endereço: Rua Mario Santos Braga, 30 - 24020-140 - Centro - Niterói/RJ

E-mail: higordac@gmail.com

Regina Celia dos Santos Sant'Anna

Graduanda em Farmácia

Instituição: Universidade Federal Fluminense

Endereço: Rua Dr. Mario Vianna, 523 - 24241-000 - Santa Rosa – Niterói/RJ

E-mail: regina_celia@id.uff.br

Fabio Aguiar-Alves

Doutor em Biologia Celular e Molecular

Instituição: Universidade Federal Fluminense

Endereço: Rua Dr. Mario Vianna, 523 - 24241-000 - Santa Rosa – Niterói/RJ

E-mail: faalves@gmail.com

Renata Freire Alves Pereira

Doutora em Ciências Médicas

Instituição: Universidade Federal Fluminense

Endereço: Rua Dr. Mario Vianna, 523 - 24241-000 - Santa Rosa – Niterói/RJ

E-mail: renatafreireapereira@gmail.com

Angélica Ribeiro Soares

Doutora em Química Orgânica

Instituição: Universidade Federal do Rio de Janeiro

Endereço: Avenida São José Barreto, 764 - 27965-045 - São José do Barreto – Macaé/RJ
E-mail: angelica.r.soares@gmail.com

Guilherme Ramos da Silva Muricy

Doutor em Bioquímica

Instituição: Museu Nacional/Universidade Federal do Rio de Janeiro

Endereço: Quinta da Boa Vista, s/n - 20940-040 - São Cristóvão - Rio de Janeiro/RJ
E-mail: muricy@mn.ufrj.br

Alessandra Leda Valverde

Doutora em Química de Produtos Naturais

Instituição: Universidade Federal Fluminense

Endereço: Rua Mario Santos Braga, 30 - 24020-140 - Centro - Niterói/RJ
E-mail: alessandravalverde@id.uff.br

RESUMO

Os oceanos cobrem mais de 70% da superfície terrestre e por isso são reservatórios de inúmeras espécies e estruturas químicas que podem ser potencialmente bioativas. Nos últimos anos o ambiente marinho recebeu maior atenção das indústrias farmacêuticas e biotecnológicas devido à diversidade de novas substâncias que podem ser descobertas. Estudos já demonstraram que esponjas marinhas possuem algum tipo de defesa contra infecções microbianas em seu habitat. Nesse sentido esses organismos são uma fonte promissora de substâncias com potencial antibiótico que devem ser investigadas como alternativas terapêuticas para a problemática da resistência aos fármacos atuais. Nesse trabalho avaliamos a atividade antimicrobiana de amostras da esponja *Ectyoplasia ferox* coletadas em diferentes locais do arquipélago de Fernando de Noronha (PE/Brasil). O ensaio antimicrobiano dos seis extratos brutos obtidos foi realizado através do método de micro diluição em caldo para determinar a Concentração Inibitória Mínima (CIM) contra *Staphylococcus aureus* HU25, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228, e *Escherichia coli* ATCC 11775. Dois extratos demonstraram atividade moderada: FN98-009 coletada na região da Ressureta (*S. aureus*: CIM = 64 µg/mL; *S. epidermidis*: CIM = 128 µg/mL) e FN98-063 coletada na região de Pedras Secas (*S. epidermidis*: CIM = 128 µg/mL). A partição por gradiente de polaridade da amostra com menor CIM (FN98-009) forneceu uma fração butanólica com atividade menor que seu extrato bruto, levando à hipótese de sinergismo entre as substâncias das diferentes frações. Como estratégia para investigar o possível efeito sinérgico e restaurar a atividade, as quatro frações foram combinadas duas a duas, originando seis amostras. Nenhuma das combinações demonstrou atividade até 512 µg/mL. Dessa forma, acredita-se que a atividade observada no extrato bruto esteja relacionada ao conjunto da maioria de seus constituintes em um efeito sinérgico e que um fracionamento biomonitorado do extrato não permitirá identificar as substâncias mais ativas, mas o potencial do extrato deve ser considerado para maiores estudos.

Palavras-chave: Produtos Naturais Marinhos, Invertebrados Marinhos, Antimicrobiano, Sinergismo.

ABSTRACT

The oceans cover more than 70% of the Earth's surface and therefore are reservoirs of numerous species and chemical structures that can be potentially bioactive. Over the last years, the marine environment has received greater attention from the pharmaceutical and biotechnological industries due to the diversity of new substances that can be discovery. Studies have already shown that marine sponges have some defense against microbial infections in their habitat. In this sense, these

organisms are a promising source of substances with antibiotic potential that should be investigated as therapeutic alternatives for the problem of resistance to current drugs. In this work, we evaluated the antimicrobial activity of samples of the sponge *Ectyoplasia ferox* collected in different cities of Fernando de Noronha archipelago (PE/Brazil). The antimicrobial assay of the six crude extracts obtained was performed using the broth microdilution method to determine the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) against *Staphylococcus aureus* HU25, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228, and *Escherichia coli* ATCC 11775. Two extracts showed moderate activity: FN98-009 collected in the Resureta region (*S. aureus*: MIC = 64 µg/mL; *S. epidermidis*: MIC = 128 µg/mL) and FN98-063 collected in the Pedras Secas region (*S. epidermidis*: MIC = 128 µg/mL). The sample with the lowest MIC (FN98-009) was partitioned by polarity gradient provided a butanolic fraction with less activity than its crude extract, leading to the hypothesis of synergism between the substances of the different fractions. As a strategy to investigate the possible synergistic effect and restore activity, the four fractions were combined two by two, giving rise to six samples. None of the combinations showed activity up to 512µg/mL. Thus, it is believed that the activity observed in the crude extract is related to the set of most of its constituents in a synergistic effect and that a biomonitored fractionation of the extract will not allow the identification of the most active substances, but the extract's potential should be considered for further studies.

Keywords: Marine Natural Products, Marine Invertebrate, Antimicrobial, Synergism

1 INTRODUÇÃO

A resistência antimicrobiana é um processo evolutivo natural dos microrganismos que geralmente ocorre através de mutações genéticas para garantir a sobrevivência da espécie. No entanto, o uso indiscriminado de medicamentos antimicrobianos está agilizando esse processo. Este cenário torna o surgimento de cepas de bactérias patogênicas resistentes aos antibióticos disponíveis no mercado, um problema de saúde pública mundial (WHO, 2018). Assim, a necessidade de novos fármacos faz pesquisadores no mundo todo investigarem em fontes naturais novas substâncias com estruturas variadas, principalmente as provenientes do metabolismo secundário, que inspirem o desenvolvimento de novos antimicrobianos (MARTINS *et al.*, 2019).

Os produtos naturais marinhos têm chamado muita atenção nas últimas décadas devido à extensa biodiversidade presente nos oceanos, constituindo um grande recurso para descoberta de novas substâncias biologicamente ativas (NWEZE *et al.*, 2020; LIU *et al.*, 2019; SALAS-SARDUY *et al.*, 2017; ZHANG *et al.*, 2017). A Psammaphin A, por exemplo, possui uma atividade antibacteriana promissora e é uma molécula derivada de esponjas marinhas (KIM *et al.*, 1999).

Dentre a biodiversidade marinha, as esponjas (filo Porífera) são consideradas fontes ricas em metabólitos secundários já que são organismos sésseis e, para garantir sua sobrevivência, desenvolveram mecanismos de defesa químico eficientes com a produção dessas substâncias (HEYDARI *et al.*, 2019; ERCOLANO *et al.*, 2019). A esponja *Ectyoplasia ferox* Duchassaing & Michelotti (1864), da família Raspailiidae, já exibiu, por exemplo, substâncias da classe das

saponinas com atividade citotóxica e antiproliferativa (COLORADO-RÍOS *et al.*, 2013; CAFIERI *et al.*, 1999; CAMPAGNUOLO *et al.*, 2001). Também foi avaliada, anteriormente, a atividade antimicrobiana de uma amostra de *E. ferox*, coletada no Caribe, contra *E. coli* (ATCC 25922) e *S. aureus* (ATCC 25923), mas as cepas foram resistentes (GALEANO *et al.*, 2007).

Ectyoplasia ferox é abundante em Fernando de Noronha, no Nordeste do Brasil, onde ocorre em diferentes locais e habitats (MORAES, 2011). Frente a possibilidades de variação no metabolismo secundário dos organismos ou até mesmo da sua microbiota associada em diferentes meios (DEWICK *et al.*, 2002; SCHMITT *et al.*, 2007), objetivamos com este estudo reavaliar o potencial antimicrobiano da esponja *E. ferox* a partir de amostras brasileiras coletadas em diferentes locais do arquipélago de Fernando de Noronha, além de investigar a atividade das frações do extrato mais promissor através de um fracionamento bioguiado.

2 METODOLOGIA

2.1 COLETA E PREPARO DAS AMOSTRAS

Amostras da esponja *Ectyoplasia ferox* foram coletadas em março de 1998 em diferentes locais no entorno do arquipélago de Fernando de Noronha – PE, Brasil (Tabela 1). A espécie foi identificada e exemplares foram depositadas no acervo do Museu Nacional da Universidade Federal do Rio de Janeiro com seus respectivos números de tombamento listados também na Tabela 1. As amostras foram armazenadas em freezer a -20°C até o preparo dos extratos. Esse projeto está cadastrado no SISGEN com número AB724BB.

Tabela 1: Dados de coleta das amostras de *Ectyoplasia ferox*

Código	Nº de tombo MNRJ	Local	Profundidade (m)	Data de Coleta
FN 98-003	21308	Cagarras funda	25	06/03/98
FN 98-009	21309	Ressureta	10-12	06/03/98
FN 98 035	21318	Lage 2 irmãos	20	08/03/98
FN 98 044	21320	Buraco do Inferno	15,5	09/03/98
FN 98 056	21325	Frade	15	10/03/98
FN 98 063	21330	Pedras Secas	16	10/03/98

As esponjas foram cortadas em pedaços e extraídas utilizando o método de maceração estática, primeiramente, com etanol absoluto (7 dias) e por duas vezes com mistura de metanol: acetato de etila (1:1 v/v, 7 dias cada). Os três extratos de cada amostra foram reunidos, concentrados em rotaevaporador e secos em *Savant Speedvac*® dando origem aos extratos brutos das esponjas.

2.2 PARTIÇÃO DOS EXTRATOS BRUTOS

Os extratos brutos foram fracionados por partição líquido-líquido em pequena escala com gradiente de polaridade. Para isso solubilizou-se, com auxílio de ultrassom, cerca de 1 g de cada extrato em 7 mL de solução metanol: água destilada (4:3, v/v). A amostra foi transferida para um tubo de ensaio e adicionou-se 7 mL de hexano seguido de agitação em vórtex por 20 segundos. As amostras foram centrifugadas por 5 minutos e retirou-se a primeira fase hexânica, com o auxílio de uma pipeta Pasteur. Adicionou-se mais 7 mL de hexano na fase aquosa/metanólica e repetiu-se o processo de agitação em vórtex e centrifugação. Reuniu-se as duas fases hexânicas e obteve-se a fração hexânica da partição.

A partir da fase aquosa/metanólica remanescente repetiu-se a metodologia supracitada com acetato de etila e posteriormente com butanol. Ao final, o procedimento forneceu 4 frações de polaridades distintas: fração de hexano (F.009Hex), acetato de etila (F.009Act), butanol (F.009But) e água (F.009Aq).

2.3 ENSAIO ANTIMICROBIANO

A concentração inibitória mínima (CIM) contra *Staphylococcus aureus* HU25, *Staphylococcus epidermidis* ATCC12228 e *Escherichia coli* ATCC 11775 foram determinados por microdiluição em caldo, de acordo com o Clinical & Laboratory Standard Institute (2012). Em placa de 96 poços, foram adicionados 180 µL de meio BHI na primeira linha e 100 µL nas restantes). Na sequência, 2,5mg do extrato a ser testado, foram diluídos em 250µL de DMSO e 20µL dessa solução foram transferidos para três poços da primeira linha, atingindo 200µ. A partir daí, 100µL do primeiro poço foram transferidos para o segundo poço e assim sucessivamente, descartando os 100µL finais. Duas colônias da bactéria selecionada para o experimento foram coletadas de placas de TSA, suspensas em 5 mL de meio BHI (Brain and Heart Infusion). A suspensão foi incubada a 37,5 °C por 4-5 horas. Após esse intervalo, a suspensão foi novamente diluída a 0,5 McFarland e 100 µL foram adicionados a cada poço da Placa produzindo para produzir as concentrações finais que variam de 4 µg/mL a 512 µg/mL. Após 24 h de incubação a 37 °C, 20 µL de resazurina a 1 mg/mL foram adicionados a cada poço, incubados posteriormente por 1 h e analisados visualmente quanto à mudança de coloração de rosa para azul. A CIM foi definida como a menor concentração do extrato que inibiu o crescimento de 99,9% do inóculo inicial.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O procedimento de extração das esponjas *E. ferox* coletadas em diferentes regiões do Arquipélago Fernando de Noronha apresentou rendimentos entre 4,39% e 7,07%. O ensaio antimicrobiano das amostras utilizando o método de microdiluição em caldo revelou dois extratos com atividade moderada: FN98-009 (coletada na região de Ressureta) e FN98-063 (coletada na região de Pedras Secas), com valores concentração inibitória mínima (CIM) descritos na Tabela 2. No geral, as amostras de *E. ferox* provenientes dos diferentes locais de coleta apresentaram uma variação intraespecífica da atividade antimicrobiana dos extratos, que pode estar relacionada com a produção dos metabólitos secundários de um organismo dependendo das condições do meio em que este organismo se encontra (DEWICK *et al.*, 2002), ou com variações na microbiota bacteriana associada as esponjas em diferentes locais. Neste último caso as bactérias endossimbiontes, frequentemente encontradas em *E. ferox* (SCHMITT *et al.*, 2007), seriam as principais responsáveis pela produção das substâncias bioativas presente nos extratos.

Tabela 2: Atividade antimicrobiana de extratos brutos de *Ectyoplasia ferox* coletadas em diferentes locais do arquipélago de Fernando de Noronha.

Código	Local de coleta	Concentração Inibitória Mínima (CIM)		
		<i>S. aureus</i> (µg/mL)	<i>S. epidermidis</i> (µg/mL)	<i>E. coli</i> (µg/mL)
FN98-003	Cagarras funda	> 512	> 512	> 512
FN98-009	Ressureta	64	128	> 512
FN98-035	Lage 2 irmãos	> 512	> 512	> 512
FN98-044	Buraco do inferno	> 512	> 512	> 512
FN98-056	Frade	> 512	> 512	> 512
FN98-063	Pedras Secas	> 512	128	> 512

O extrato bruto de *E. ferox* com a menor CIM (FN98-009) foi particionado com gradiente de polaridade em pequena escala, porém as quatro frações resultantes não apresentaram inibição do crescimento das bactérias até 512 µg/mL (maior concentração testada), com exceção da fração butanólica que, apesar disso, revelou atividade inferior a do extrato bruto para *S. aureus* (CIM = 128 µg/mL). Esse resultado revela que as substâncias que constituem o extrato bruto, quando separadas, diminuem sua capacidade inibitória, indicando a presença de efeito sinérgico entre substâncias de diferentes frações.

Na tentativa de identificar as frações cuja as substâncias apresentariam sinergismo, realizou-se novamente o ensaio antimicrobiano com as frações da partição combinadas duas a duas: C1= F.But + F.Act; C2 = F.But + F.Hex; C3 = F.Act + F.Hex; C4 = F.Hex + F.Aq; C5 = F.Aq + F.Act; C6 = F.Aq + F.But. No entanto, nenhuma das seis combinações, apresentou atividade inibitória (MIC > 512 µg/mL), ou seja, além de não recuperar a atividade observada no extrato, também foi

perdida a atividade observada anteriormente na fração butanólica quando esta foi associada a outras frações. O resultado pode ter decorrido de variações na concentração das substâncias nas frações quando combinadas, e sugere a atividade observada no extrato bruto esteja relacionada a um efeito sinérgico de diversos de seus constituintes, de polaridades distintas.

Dessa forma, os resultados da abordagem experimental utilizada nesse trabalho revelaram o potencial antimicrobiano moderado de extratos da esponja marinha *Ectyoplasia ferox* dependente do seu local de coleta. Além disso trouxe evidências da presença de sinergismo em um dos extratos que, nesse caso, torna inviável a identificação dos princípios ativos por meio de fracionamento biomonitorado. Estudos adicionais devem incluir amostras de outros ambientes e análises separando as atividades da esponja das bactérias associadas.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos à Prof. Dr. Rosângela de Almeida Epifânio (*in memoriam*) por todo empenho e dedicação à pesquisa além do material biológico cedido que é essencial para todos os trabalhos realizados até hoje. Agradecemos também ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES, código financeiro 001) pelo apoio financeiro.

REFERÊNCIAS

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Antimicrobial resistance**. 2018. Disponível em: <<http://www.who.int/en/news-room/factsheets/detail/antimicrobial-resistance>>. Acesso em: 03 de maio de 2020.

CAFIERI, F.; Fattorusso, E.; Tagliatela-Scafati, O. **Ectyoplasides A–B – Unique Triterpene Oligoglycosides from the Caribbean Sponge *Ectyoplasia ferox***. European Journal of Organic Chemistry, v. 1999, n. 1, p. 231-38, 1999.

CAMPAGNUOLO, C.; Fattorusso, E.; Tagliatela-Scafati, O. **Feroxosides A-B, two norlanostane tetraglycosides from the Caribbean sponge *Ectyoplasia ferox***. Tetrahedron, v. 57, n. 18, p. 4049–55, 2001.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). **Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically**. Approved Standard 9th ed. CLSI document M07-A9. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2012.

COLORADO-RÍOS, J.; Muñoz, D.; Montoya, G.; Márquez, D.; Márquez, M.-E.; López, J.; Martínez, A. **HPLC-ESI-IT-MS/MS Analysis and Biological Activity of Triterpene Glycosides from the Colombian Marine Sponge *Ectyoplasia ferox***. Marine Drugs, v. 11, n. 12, p. 4815-4833, 2013.

DEWICK, P. M.; **Medicinal Natural Products: A biosynthetic approach**, 2ª edição, Wiley, 2002.

ERCOLANO, G.; De Cicco, P.; Ianaro, A. **New Drugs from the Sea: Pro-Apoptotic Activity of Sponges and Algae Derived Compounds**. Marine Drugs, v. 17, n. 1, p. 31-62, 2019.

GALEANO, E.; Martínez A. **Antimicrobial activity of marine sponges from Urabá Gulf, Colombian Caribbean region**. Journal de Mycologie Médicale, v. 17, n. 1, p.:21-24, 2007.

HEYDARI, H.; Gözcelioğlu, B.; Konuklugil, B. **Biodiversity and Secondary Metabolites of Marine Sponges from Turkey**. Records of Natural Products, v. 13, n.5, p. 367-78, 2019.

KIM, D.; II Lee, S.; Jung, J. H.; Yang, Sung-II. **Psammaphin A, a Natural Bromotyrosine Derivative from a Sponge, Possesses the Antibacterial Activity against Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and the DNA Gyrase-inhibitory Activity**. Archives of Pharmacal Research, v. 22, n. 1, p. 25-29, 1999.

LIU, M.; El-Hossary, E. M.; Oelschlaeger, T. A.; Donia, M. S.; Quinn, R. J.; Abdelmohsen, U. R. **Potential of marine natural products against drug-resistant bacterial infections**. The Lancet Infectious Diseases, v. 19, n. 7, p. 237-45, 2019.

MARTINS, F. W. P.; Casali, A. K. **Atividade antimicrobiana in vitro de extratos etanólicos de Romã (*Punica granatum L.*) sobre as bactérias *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus***. Brazilian Journal of Development, v. 5, n. 11, p. 22970-980, 2019.

MORAES, F.C. **Esponjas das ilhas oceânicas brasileiras**. Série Livros 44. Museu Nacional, Rio de Janeiro. 252 pp., 2011.

NWEZE, J. A.; Mbaoji, F. N.; Huang, G.; Li, Y.; Yang, L.; Zhang Y.; Huang, S.; Pan, L.; Yang, D. **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. 145-70, 2020.

SALAS-SARDUY, E.; Guerra, Y.; Cortés, , G. C.; Avilés, F. X.; Planes, M. A. C. **Identification of Tight-Binding Plasmepsin II and Falcipain 2 Inhibitors in Aqueous Extracts of Marine Invertebrates by the Combination of Enzymatic and Interaction-Based Assays.** *Marine Drugs*, v. 15, n. 4, p. 123-49, 2017.

SCHMITT, S.; WEHRL, M.; LINDQUIST, N.; WEISZ, J.B.; HENTSCHEL, U. **Morphological and molecular analyses of microorganisms in Caribbean reef adult sponges and in corresponding reproductive material.** *In: CUSTÓDIO, M.R, LÔBO-HAJDU, G.; HAJDU, E.; MURICY, G. Porifera Research. Biodiversity, Innovation and Sustainability. Rio de Janeiro: Livros de Museu Nacional, 2007, p .561-568.*

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Antimicrobial resistance.** 2018. Disponível em: <<http://www.who.int/en/news-room/factsheets/detail/antimicrobial-resistance>>. Acesso em: 03 de maio de 2020.

ZHANG, H.; Dong, M.; Chen, J.; Wang, H.; Tenney, K.; Crews, P. **Bioactive Secondary Metabolites from the Marine Sponge Genus *Agelas*.** *Marine Drugs*, v. 15, n. 11, p. 351-80, 2017.