



## **AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIMICROBIANO DAS FRAÇÕES RICAS EM SURFACTINAS IDENTIFICADAS NAS CEPAS MARINHAS APA04 E APA06G**

**Lucas Hlavnicka Nogueira<sup>1</sup>; Gabriel Henrique de Souza Alvez Glória<sup>2</sup>; José Brango  
Vanegas<sup>3</sup>; Octávio Luiz Franco<sup>4</sup>**

<sup>1</sup>Biomedicina – Universidade Católica de Brasília;

<sup>2</sup>Medicina – Universidade Católica de Brasília;

<sup>3</sup>Química – Universidade de Brasília;

<sup>4</sup>Biotecnologia – Universidade Católica de Brasília.

E-mail: lucas.hlavnicka@ucb.br; gabriel.gloria@ucb.br; josbrang@gmail.com; ocfranco@gmail.com

### **RESUMO**

A agricultura e a pecuária são setores fundamentais para a economia brasileira, tornando a segurança de produtos como leite e carnes uma questão relevante diante de infecções causadas por microrganismos. Nesse contexto, este projeto avaliou o potencial antimicrobiano de duas cepas de bactérias marinhas, APA04 e APA06G, isoladas de águas associadas a corais do litoral brasileiro. Por sua relação com macroorganismos, essas bactérias apresentam potencial para produzir metabólitos bioativos de interesse biotecnológico. O estudo investigou a atividade antibacteriana das cepas e de seus extratos e frações frente a *Staphylococcus aureus* 117 e 118, além da atividade antifúngica contra *Candida albicans* e *Candida krusei*. Foram realizados cultivos bacterianos, obtenção de extratos e fracionamento do sobrenadante, seguidos de análise por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (LC-MS). Ensaios in vitro também foram conduzidos para determinar a concentração inibitória mínima (CIM) dos extratos e frações frente aos microrganismos avaliados.

**Palavras-chave:** HPLC-MS. Bactérias marinhas. Metabolômica. Antimicrobianos. Surfactinas.

### **INTRODUÇÃO**

A produção farmacêutica moderna de antibióticos depende, em grande parte, de modificações semissintéticas de produtos naturais antimicrobianos de origem terrestre. Entretanto, a crescente resistência bacteriana e a lenta progressão no desenvolvimento de novas propostas terapêuticas evidenciam a necessidade de explorar fontes alternativas de compostos bioativos (Hughes & Fenical, 2010; Romero et al., 2011). Esse cenário é particularmente relevante na saúde animal, considerando a ocorrência de bactérias resistentes associadas a infecções como a mastite bovina (SOUZA et al., 2016). Nesse contexto, os produtos naturais de origem marinha representam uma fonte promissora de novos agentes antimicrobianos.

Os organismos marinhos estão constantemente expostos a microrganismos e desenvolveram mecanismos de defesa química baseados na produção de diferentes compostos bioativos. Muitos desses metabólitos são produzidos por comunidades microbianas associadas, contribuindo para o controle da microbiota e para a competição por espaço (Piel, 2009; Xu-Wen, 2020). Bactérias associadas a invertebrados marinhos podem produzir metabólitos secundários, como peptídeos, policetídeos, terpenos e alcaloides, com diversas atividades biológicas. Além disso, a produção desses compostos pode ocorrer em condições laboratoriais, favorecendo sua exploração biotecnológica (Penesyan et al., 2010; Kelecom, 2002).

A relevância dos produtos naturais marinhos é evidenciada pela identificação de moléculas com atividades antibacteriana, antiviral, antitumoral e anti-inflamatória (Mayer et al., 2013). Entre os compostos produzidos por microrganismos associados a organismos marinhos, destacam-se



moléculas de interesse farmacológico, como briostatinas e pseudopterosinas (Synnes, 2007; Haefner, 2003).

A agricultura e a pecuária são setores essenciais da economia brasileira, e as doenças infecciosas representam um importante desafio para a manutenção da produtividade e da segurança desses sistemas (BRASIL, 2014). Dessa forma, este projeto realizou a bioprospecção, por meio de estudo metabolômico, de metabólitos produzidos pelas cepas marinhas APA04 e APA06G, isoladas de corais do litoral brasileiro, visando identificar moléculas com potencial antimicrobiano e possível aplicação no controle de infecções em animais de produção.

## OBJETIVO

Identificar e caracterizar as surfactinas presentes nas frações de acetato de etila das bactérias marinhas APA04 e APA06G, avaliando seu potencial antimicrobiano, especialmente contra agentes etiológicos associados a infecções em animais de produção, como *Staphylococcus aureus* causador de mastite bovina.

## MÉTODO

As cepas marinhas APA04 e APA06G foram cultivadas em Meio Ótimo para Produção de Lipopeptídeos (MOLP), enquanto *Staphylococcus aureus* (117 e 118) e *Enterobacter cloacae* foram cultivados em meio Mueller-Hinton (MH), e *Candida albicans* e *Candida krusei* em meio YPD. A atividade antimicrobiana das cepas marinhas foi inicialmente avaliada por antibiograma frente aos microrganismos testados. Após o preparo dos inóculos, estes foram ajustados para OD entre 0,6 e 0,7 e utilizados para formação de tapetes microbianos. As cepas APA04 e APA06G foram aplicadas em triplicata sobre os tapetes, juntamente com controles positivo e negativo. Após incubação, foram avaliados os halos de inibição. O mesmo procedimento foi realizado com os sobrenadantes obtidos após centrifugação.

Posteriormente, as cepas APA04 e APA06G foram cultivadas em maior escala (250 mL), e as células foram removidas por centrifugação. Os sobrenadantes foram submetidos à extração líquido-líquido utilizando acetato de etila (AcOEt) e butanol (BuOH), e os extratos foram concentrados por evaporação em rotaevaporador. O extrato residual aquoso foi congelado e liofilizado. Os extratos obtidos também foram avaliados por antibiograma, utilizando o meio MOLP sem inóculo como controle. O extrato de AcOEt de APA04 e do MOLP foi posteriormente submetido à cromatografia em coluna flash (CCFlash), utilizando hexano, AcOEt e metanol em diferentes gradientes de polaridade: hexano 100%, hexano/AcOEt 9:1, 7:3 e 1:1, AcOEt 100% e AcOEt/metanol 1:1. As frações obtidas foram concentradas por evaporação em rotaevaporador e SpeedVac.

A atividade das frações e extratos foi posteriormente avaliada por ensaios de concentração inibitória mínima (CIM). Para isso, os microrganismos foram cultivados, e os inóculos foram preparados e ajustados até OD 0,1 a 600 nm. Após diluição de 100 vezes, 50 µL da suspensão celular foram adicionados a cada poço juntamente com 50 µL das frações testadas. Foram avaliadas sete concentrações por diluição seriada, em triplicata. Para *E. cloacae*, foram utilizados os extratos de AcOEt de APA04, APA06G e MOLP; para *S. aureus* (117 e 118), *C. albicans* e *C. krusei*, foram utilizados os extratos de APA04, APA06G e MOLP, além das frações cromatográficas de APA04 e MOLP.

Por fim, os extratos foram analisados por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (LC-MS/MS), permitindo a detecção das moléculas presentes no meio MOLP e produzidas pelas cepas APA04 e APA06G. Os dados obtidos foram comparados à base *Global Natural Products Social Molecular Networking* (GNPS2), possibilitando a anotação dos metabólitos, o mapeamento de redes moleculares e a correlação das moléculas detectadas com compostos similares e atividades biológicas descritas na literatura.



## RESULTADOS

Os testes de antibiograma e concentração inibitória mínima (CIM) demonstraram atividade antimicrobiana de algumas frações dos extratos de acetato de etila de APA04 e do meio MOLP frente a *Staphylococcus aureus* 117 e 118, *Candida albicans* e *Candida krusei*. Para *S. aureus* 118, a inibição foi observada nas frações Hexano/AcOEt 9:1, 7:3 e 1:1 de APA04 e MOLP. Para *S. aureus* 117, foram observadas atividades nas frações de APA04 Hexano/AcOEt 9:1, 7:3, 1:1 e AcOEt 100%, além das frações de MOLP Hexano/AcOEt 7:3 e 1:1.

Para *C. albicans*, a atividade foi observada nas frações Hexano/AcOEt 9:1, 7:3 e 1:1 de APA04 e MOLP, além de AcOEt 100% e AcOEt/Metanol 1:1 de APA04. Para *C. krusei*, foram observadas atividades nas frações Hexano/AcOEt 9:1, 7:3 e 1:1 de APA04 e MOLP, além de AcOEt 100% de APA04.

**Tabela 1.**

*Concentração Inibitória Mínima (CIM) das frações de APA04 obtidas por CCFlash contra os fungos estudados.*

|                            | <i>Candida albicans</i> | <i>Candida krusei</i> |
|----------------------------|-------------------------|-----------------------|
| Hexano/AcOEt (9:1) – APA04 | 106,2 ug/mL             | 106,2 ug/mL           |
| Hexano/AcOEt (7:3) – APA04 | 212,5 ug/mL             | 53,1 ug/mL            |
| Hexano/AcOEt (1:1) – APA04 | 212,5 ug/mL             | 106,2 ug/mL           |
| AcOEt 100%– APA04          | 425 ug/mL               | 212,5 ug/mL           |
| Anfotericina B             | 53,1 ug/mL              | 53,1 ug/mL            |

Nota. CIM = concentração inibitória mínima; CCFlash = cromatografia em coluna flash; AcOEt = acetato de etila. Os valores estão expressos em µg/mL.

Fonte. Resultados experimentais do projeto (2026).

**Tabela 2.**

*Concentração Inibitória Mínima (CIM) das frações de MOLP obtidas por CCFlash contra os fungos estudados.*

|                           | <i>Candida albicans</i> | <i>Candida krusei</i> |
|---------------------------|-------------------------|-----------------------|
| Hexano/AcOEt (9:1) – MOLP | 212,5 ug/mL             | 212,5 ug/mL           |
| Hexano/AcOEt (7:3) – MOLP | 212,5 ug/mL             | 106,2 ug/mL           |
| Hexano/AcOEt (1:1) – MOLP | 212,5 ug/mL             | 106,2 ug/mL           |
| Anfotericina B            | 53,1 ug/mL              | 53,1 ug/mL            |

Nota. CIM = concentração inibitória mínima; CCFlash = cromatografia em coluna flash; AcOEt = acetato de etila. Os valores estão expressos em µg/mL.

Fonte. Resultados experimentais do projeto (2026).

Das moléculas detectadas por meio da LC-MS/MS, destaca-se as presentes apenas nos extratos de acetato de etila da APA06G e APA04 (não detectadas no meio controle MOLP) similares à Surfactina D com base em seu peso molecular (1036,363 u), indicando a presença da mesma ou de moléculas homólogas a essa, como a Surfactina B ou C. Na análise metabolômica do ext. AcOEt de APA06G, os metabólitos similares reconhecidos possuíam peso molecular de 1050,7 u (presença adicional de um carbono e dois hidrogênios), 1064,7203 u (presença adicional de dois carbonos e quatro hidrogênios) e 1078,7362 u (presença adicional de três carbonos e seis hidrogênios). Já o ext. AcOEt de APA04 apresentou metabólitos de 1036,6888 (presença adicional de um carbono e dois hidrogênios) e 1050,705 u (presença adicional de um carbono e dois hidrogênios). A Surfactina D é um peptídeo cíclico com atividade antimicrobiana confirmada de peso molecular de 1036,363 u e fórmula molecular C<sub>54</sub>H<sub>95</sub>N<sub>7</sub>O<sub>13</sub> (Singh et al., 2004).



## CONCLUSÃO

As cepas marinhas APA04 e APA06G demonstraram potencial para a produção de metabólitos com atividade antimicrobiana frente aos microrganismos avaliados, destacando-se a presença de moléculas compatíveis com surfactinas nos extratos de acetato de etila. As análises por LC-MS/MS permitiram detectar moléculas análogas à Surfactina D nos extratos de ambas as cepas, não observadas no meio controle MOLP. Além disso, algumas frações apresentaram atividade inibitória contra *Staphylococcus aureus* 117 e 118, *Candida albicans* e *Candida krusei*. Esses resultados reforçam o potencial biotecnológico das cepas APA04 e APA06G como fontes de lipopeptídeos bioativos e indicam a necessidade de estudos adicionais para confirmar a identidade estrutural das surfactinas detectadas e avaliar seu potencial antimicrobiano.

## REFERÊNCIAS

- Andrade, L. C. (2014). *Bioprospecção de microrganismos marinhos isolados na Baía de Todos os Santos com atividade antagonista a bactérias patogênicas* [Dissertação de mestrado, Universidade Federal da Bahia]. Repositório Institucional da Universidade Federal da Bahia.
- Hughes, C. C., & Fenical, W. (2010). Antibacterials from the sea. *Chemistry – A European Journal*, 16(42), 12512–12525. <https://doi.org/10.1002/chem.201001279>
- Kelecom, A. (2002). Secondary metabolites from marine microorganisms. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 74(1), 151–170. <https://doi.org/10.1590/S0001-37652002000100012>
- Mayer, A. M. S., Rodríguez, A. D., Taglialatela-Scafati, O., & Fusetani, N. (2017). Marine pharmacology in 2012–2013: Marine compounds with antibacterial, antidiabetic, antifungal, anti-inflammatory, antiprotozoal, antituberculosis, and antiviral activities; affecting the immune and nervous systems, and other miscellaneous mechanisms of action. *Marine Drugs*, 15(9), 273. <https://doi.org/10.3390/md15090273>
- Penesyan, A., Kjelleberg, S., & Egan, S. (2010). Development of novel drugs from marine surface associated microorganisms. *Marine Drugs*, 8(3), 438–459. <https://doi.org/10.3390/md8030438>
- Piel, J. (2009). Metabolites from symbiotic bacteria. *Natural Product Reports*, 26(3), 338–362. <https://doi.org/10.1039/B703499G>
- Romero, D., Traxler, M. F., López, D., & Kolter, R. (2011). Antibiotics as signal molecules. *Chemical Reviews*, 111(9), 5492–5505. <https://doi.org/10.1021/cr2000509>
- Singh, P., & Cameotra, S. S. (2004). Potential applications of microbial surfactants in biomedical sciences. *Trends in Biotechnology*, 22(3), 142–146. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2004.01.010>
- Souza, K. S. S., Oliveira, Y. C. M., Duarte, A. F. V., Oliveira, T. C., Veloso, Á. L. C., Oliveira, P. M. C., & Fernandes, N. S. F. (2016). Avaliação da sensibilidade dos agentes etiológicos causadores da mastite subclínica a antimicrobianos em vacas leiteiras. *Caderno de Ciências Agrárias*, 8(2), 83–89.
- Synnes, M. (2007). Bioprospecting of organisms from the deep sea: Scientific and environmental aspects. *Clean Technologies and Environmental Policy*, 9(1), 53–59. <https://doi.org/10.1007/s10098-006-0062-7>

**Financiamento:** Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), por meio do Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica (PIBIC).