

UNIVERSIDADE SÃO FRANCISCO

Programa de Pós-Graduação Stricto Sensu em Ciências da Saúde

**CLARA BRITO ALVES**

**AÇÃO ANTIMICROBIANA DE COMPOSTOS ISOLADOS DE  
ANÊMONAS-DO-MAR EM BACTÉRIAS  
MULTIRRESISTENTES**

Bragança Paulista

2025

**CLARA BRITO ALVES – R.A. 202451574**

**AÇÃO ANTIMICROBIANA DE COMPOSTOS ISOLADOS DE  
ANÊMONAS-DO-MAR EM BACTÉRIAS  
MULTIRRESISTENTES**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciências da Saúde da Universidade São Francisco, como requisito para obtenção do Título de Mestre em Ciências da Saúde.

Área de Concentração: Ciências da Saúde

Orientador: Prof.(a) Dr.(a) Juliana Mozer Sciani.

Bragança Paulista

2025

QW 630.5 M3 Alves, Clara Brito

A478a

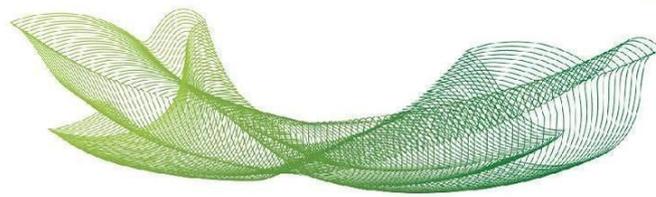
Ação antimicrobiana de compostos isolados de anêmonas-do-mar em bactérias multirresistentes / Clara Brito Alves. -- Bragança Paulista, 2025.

36 p.

Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciências da Saúde da Universidade São Francisco.

Orientação de: Juliana Mozer Sciani.

1. Toxinas marinhas. 2. Farmacorresistência Bacteriana.  
3. Venenos de Cnidários. I. Sciani, Juliana Mozer. II. Título.



**ALVES, Clara Brito.** “Ação antimicrobiana de compostos isolados de anêmonas-do-mar em bactérias multirresistentes”. Dissertação defendida e aprovada no programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciências da Saúde da Universidade São Francisco em 10 de dezembro de 2025 pela Banca examinadora constituída pelos(as) professores(as):

Prof(a). Dr(a). Juliana Mozer Sciani  
Orientador(a) e Presidente  
Universidade São Francisco

Prof(a). Dr(a). Rita de Cássia Ruiz  
(por videoconferência)  
Instituto Butantan

Prof(a). Dr(a). Thais Parisotto Ulmer  
Universidade São Francisco

## **AGRADECIMENTOS**

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) – Código de Financiamento: 88887.994608/2024-00.

Ao Laboratório de Microbiologia da universidade São Francisco pela parceria e fornecimento de cepas e isolados clínicos.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação Stricto Sensu em Ciências da Saúde da Universidade São Francisco, em especial a Professora Raquel Girardello, Professor Thiago Rojas, Professor Emídio Beraldo e Professora Natália Conceição Rocha.

À minha orientadora, Professora Doutora Juliana Mozer Sciani, pela confiança depositada, pela paciência inestimável, e por toda a orientação, auxílio e constante estímulo ao longo deste processo.

## RESUMO

O uso indiscriminado de antibióticos tem levado muitas bactérias a desenvolverem mecanismos de resistência, tornando o tratamento contra infecções cada vez mais difícil. Esse fenômeno, conhecido como resistência antimicrobiana, resulta na diminuição da eficácia dos antibióticos convencionais, o que exige a busca urgente por alternativas terapêuticas inovadoras. Dentre as possibilidades, os compostos naturais, incluindo aqueles produzidos por organismos marinhos, emergem como uma fonte valiosa de novos agentes antimicrobianos. Assim, este estudo investiga as propriedades antimicrobianas de compostos extraídos de anêmonas-do-mar contra cepas de bactérias multirresistentes. A pesquisa envolveu a coleta dos animais marinhos, extração dos compostos, fracionamento por HPLC e caracterização molecular por espectrometria de massas, sendo o fracionamento guiado por ensaios antimicrobianos por disco-difusão, microdiluição em caldo e ensaio biocida. Em um primeiro ensaio de disco-difusão, foi selecionada a espécie *Anthopleura cascaia*, com atividade antimicrobiana em *Klebsiella pneumoniae*. A partir disso, o veneno desta anêmona-do-mar foi fracionado, e as frações testadas novamente, no ensaio de microdiluição. Foi possível obter uma fração ativa, que foi caracterizada como tetrabutylamônio (TBA). O composto foi obtido comercialmente, com um contra-íon de sulfato, e testado contra vários isolados clínicos de *Klebsiella pneumoniae* resistentes, no ensaio de microdiluição. Foi visto que o TBA inibiu o crescimento de algumas cepas, em cerca de 30%, e em outras não teve efeito. Os isolados que tiveram o crescimento mais comprometido foram utilizados em um ensaio biocida, e foi vista uma importante atividade antimicrobiana proveniente de amostras clínicas. Apesar do TBA ser um composto conhecido, nunca foi vista sua atividade antibacteriana contra bactérias clínicas, especialmente em *Klebsiella pneumoniae*, resistentes a antibióticos. Desta forma, esse composto tem uma potencial aplicação terapêutica no combate a infecções hospitalares resistentes aos antibióticos convencionais, contribuindo para o desenvolvimento de alternativas terapêuticas baseadas em produtos naturais marinhos.

**Palavras-chave:** Toxinas marinhas. Farmacorresistência Bacteriana. Venenos de Cnidários.

## ABSTRACT

The indiscriminate use of antibiotics has led many bacteria to develop resistance mechanisms, making the treatment of infections increasingly difficult. This phenomenon, known as antimicrobial resistance, results in the decreased efficacy of conventional antibiotics, which urgently demands the search for innovative therapeutic alternatives. Among the possibilities, natural compounds, including those produced by marine organisms, emerge as a valuable source of new antimicrobial agents. Thus, this study investigates the antimicrobial properties of compounds extracted from sea anemones against multidrug-resistant bacteria strains. The research involved the collection of marine animals, compound extraction, HPLC fractionation, and molecular characterization by mass spectrometry, with the fractionation being guided by antimicrobial assays using disk-diffusion, broth microdilution, and a biocidal assay. In an initial disk-diffusion assay, the species *Anthopleura cascaia* was selected, showing antimicrobial activity against *K. pneumoniae*. Subsequently, the venom of this sea anemone was fractionated, and the fractions were tested again in the microdilution assay. It was possible to obtain an active fraction, which was characterized as tetrabutylammonium (TBA). The compound was commercially obtained, with a sulfate counter-ion, and tested against several resistant clinical isolates of *K. pneumoniae* in the microdilution assay. It was observed that TBA inhibited the growth of some strains by about 30%, and had no effect on others. The isolates whose growth was most compromised were used in a biocidal assay, and significant antimicrobial activity was observed. Despite TBA being a known compound, its antibacterial activity against clinical bacteria, especially antibiotic-resistant *K. pneumoniae*, had never been observed before. Therefore, this compound has a potential therapeutic application in combating hospital infections resistant to conventional antibiotics, contributing to the development of therapeutic alternatives based on marine natural products.

**Keywords:** Marine Toxins. Antibacterial Drug Resistance. Cnidarian Venoms.

## LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIACÕES

AMPs – Peptídeos Antimicrobianos

GLASS – Global Antimicrobial Resistance and Use Surveillance

KPC – *Klebsiella pneumoniae carbapenemase*

NDM – New Delhi Metallo-beta-lactamase

OMS – Organização Mundial da Saúde

**SUMÁRIO**

|                                |    |
|--------------------------------|----|
| 1.INTRODUÇÃO.....              | 9  |
| 2.OBJETIVO.....                | 16 |
| 2.1.Objetivo Geral.....        | 16 |
| 2.2.Objetivos Específicos..... | 16 |
| 3.CAPÍTULO 1.....              | 17 |
| 4.CONCLUSÃO.....               | 35 |
| REFERÊNCIAS.....               | 36 |

## 1. INTRODUÇÃO

O crescente problema da resistência bacteriana é um dos maiores desafios enfrentados pela medicina atualmente. O uso indiscriminado de antibióticos tem levado muitas bactérias a desenvolverem mecanismos de resistência, tornando o tratamento de infecções cada vez mais difícil. Esse fenômeno, conhecido como resistência antimicrobiana, resulta na diminuição da eficácia dos antibióticos convencionais, o que exige a busca por alternativas terapêuticas. Dentre as possibilidades, os compostos naturais produzidos por organismos marinhos representam uma fonte rica e inexplorada de novos agentes antimicrobianos (ABRANTES; NOGUEIRA, 2022).

O cenário global da resistência aos antimicrobianos representa uma das mais graves e urgentes ameaças à saúde pública da atualidade. A disseminação de bactérias multirresistentes, especialmente em ambientes hospitalares, como em unidades de terapia intensiva, têm se elevado comprometendo a eficácia de antibióticos de último recurso. Fatores como o uso indiscriminado e excessivo de antimicrobianos e a falta de investimentos para descoberta de novas drogas impulsionaram essa crise (NAGHAVI, et al., 2024).

Projeções futuras indicam que, se o panorama atual não for revertido, as infecções resistentes poderão se tornar a principal causa de morte no mundo, superando o câncer e acidentes de trânsito, e culminando em cerca de 10 milhões de mortes anuais até 2050. Essa mortalidade é desproporcionalmente sentida em países de baixa e média renda, onde o acesso a diagnósticos rápidos, tratamentos adequados e programas de controle de infecção é limitado (SATI, et al., 2015).

A respeito da mortalidade associada à resistência bacteriana, estimativas recentes publicadas evidenciam o caráter devastador do problema, em que aproximadamente 5 milhões de mortes foram associadas à resistência antimicrobiana, com 1,3 milhão de óbitos sendo atribuídos diretamente à infecção por bactérias multirresistentes, e até 2050 estima-se um acúmulo de 39 milhões de mortes ocasionadas. A Organização Mundial da Saúde (OMS) e o Global Antimicrobial Resistance and Use Surveillance System (GLASS) monitoram patógenos críticos como *Acinetobacter baumannii* e *Pseudomonas aeruginosa* resistentes a carbapenêmicos, e *Enterobacterales* produtoras de carbapenemases (KPC e NDM), se destacando pelo alto potencial de causar infecções intratáveis (NAGHAVI, et al., 2024).

Em resposta à crise, o Brasil, por meio de seus órgãos de saúde, monitora ativamente a situação, observando tendências como a detecção de *Enterobacterales* resistentes aos carbapenêmicos, onde se notou em boletins recentes, a tendência crescente da presença do gene blaNDM ao longo dos anos (BRASIL, 2024).

Contudo, a ameaça das bactérias multirresistentes além da clínica, torna-se econômica. Infecções resistentes aumentam o tempo de internação e, conseqüentemente, elevam os custos hospitalares. Devido ao uso de medicamentos mais caros e maior necessidade de leitos especializados, a multirresistência impõe um custo direto adicional significativo por paciente, como na necessidade de leitos em unidades de terapia intensiva. Portanto, o combate à mortalidade exige uma abordagem dupla e imediata, contando com o desenvolvimento de novas drogas associado ao uso racional dos antimicrobianos, bem como o aprimoramento urgente das práticas de higienização e controle de infecção (RIU et al., 2016).

As infecções causadas por bactérias multirresistentes são um problema crescente no ambiente hospitalar, representando um desafio significativo para o controle de infecções e tratamento de pacientes. São responsáveis por uma variedade de infecções nosocomiais, como pneumonia, infecções do trato urinário e septicemia, que frequentemente complicam a recuperação dos pacientes e aumentam as taxas de mortalidade. A *Acinetobacter baumannii*, por exemplo, é notoriamente resistente a múltiplos antibióticos, o que dificulta seu tratamento, enquanto a *Escherichia coli* e a *Klebsiella pneumoniae* também têm demonstrado resistência crescente, especialmente com o uso indiscriminado de antibióticos nos ambientes hospitalares. Essa resistência compromete significativamente os tratamentos convencionais e coloca em risco a saúde pública, demandando urgentemente a descoberta de novos agentes antimicrobianos (QUEIROZ; MACIEL; SANTOS, 2022; SANTANA et al., 2012).

Segundo Huang et al. (2024), destacam que as polimixinas, uma classe de antibióticos polipeptídicos usados para tratar infecções graves causadas por bactérias aeróbicas Gram-negativas multirresistentes, reapareceram no cenário clínico em consequência ao aumento de bactérias Gram-negativas resistentes, mas apresentam limitações importantes, como a nefrotoxicidade e risco de resistência a eles também, fenômeno já visto na clínica. A terapêutica de última linha para infecções por bactérias Gram-negativas multirresistentes, como as produtoras de carbapenemases, tem se

apoiado em classes como os polimixinas e novas combinações  $\beta$ -lactâmicos/inibidores de  $\beta$ -lactamase.

A capacidade de resistir a antibióticos, incluindo carbapenêmicos, tem sido uma preocupação crescente, tornando essas infecções mais desafiadoras de tratar. A cepa de *Klebsiella pneumoniae*, por exemplo, possui vários fatores de virulência que contribuem para sua patogenicidade, que inclui a presença de cápsula bacteriana, que desempenha um papel importante na resistência à fagocitose pelo sistema imunológico. Outros fatores, como fímbrias e aderência a superfícies celulares, também estão envolvidos na capacidade da bactéria de se ligar e colonizar tecidos hospedeiros (QUEIROZ; MACIEL; SANTOS, 2022).

A resistência aos antibióticos, portanto, é uma característica preocupante associada a cepas de *Klebsiella*, que está frequentemente associada a infecções hospitalares, particularmente em pacientes com sistemas imunológicos comprometidos. A disseminação ocorre principalmente através do contato direto com superfícies contaminadas ou de pessoa para pessoa, sendo a higienização adequada das mãos e práticas de controle de infecções essenciais na prevenção (PEDROSO, 2021).

Assim como *Klebsiella*, a cepa *Acinetobacter baumannii* é frequentemente associada a infecções hospitalares. A disseminação ocorre principalmente em ambientes de cuidados de saúde através do contato com superfícies contaminadas e, em alguns casos, por meio de dispositivos médicos. O diagnóstico de infecções por *Acinetobacter* geralmente envolve culturas microbiológicas a partir de amostras clínicas. O tratamento é complicado pela resistência a antibióticos, e a escolha de terapias eficazes muitas vezes requer testes de sensibilidade específicos (COSTA, 2010).

A *Klebsiella pneumoniae* tem sido considerada um dos patógenos de maior preocupação no cenário mundial, possui capacidade de adquirir e disseminar genes de resistência antimicrobiana. Segundo Navon-Venezia, Kondratyeva e Carattoli (2017), destacam que essa espécie atua como um importante vetor de resistência, acumulando genes que atribuem multirresistência a diferentes classes de antibióticos. Essa característica tem contribuído para o cenário atual de cepas com resistência extrema, especialmente às cefalosporinas de terceira geração e aos carbapenêmicos, reduzindo de modo significativo as opções terapêuticas disponíveis e aumentando as taxas de morbimortalidade associadas às infecções por esse agente.

De acordo com Hu, Feng e Zong (2024), a *Klebsiella pneumoniae* produtora de  $\beta$ -lactamases de espectro estendido tem se mostrado prioritariamente preocupante em populações vulneráveis, como por exemplo neonatos hospitalizados. A alta incidência de surtos associados a esse patógeno em unidades de terapia intensiva neonatal evidencia seu potencial de disseminação e a dificuldade de controle em ambientes hospitalares. Diante desse cenário, a OMS classificou a *K. pneumoniae* resistente a carbapenêmicos e cefalosporinas de terceira geração como um patógeno de prioridade crítica para pesquisa e desenvolvimento de novos antibióticos.

O diagnóstico de infecções por *K. pneumoniae* é geralmente feito por meio de culturas microbiológicas a partir de amostras clínicas. O tratamento pode ser desafiador devido à resistência a antibióticos, e a escolha de agentes antimicrobianos eficazes muitas vezes requer testes de sensibilidade específicos. Em resumo, enquanto algumas espécies de *K. pneumoniae* são componentes normais da microbiota humana, certas cepas têm a capacidade de causar infecções graves, sendo uma preocupação significativa em ambientes hospitalares devido à sua resistência a antibióticos (PEDROSO, 2021).

Assim, o desenvolvimento de novas terapias baseadas em compostos antimicrobianos extraídos de organismos marinhos pode ser uma solução para o tratamento de infecções resistentes a antibióticos, especialmente em ambientes hospitalares (HAN et al., 2020).

De acordo com Machado e Sousa (2025), a persistente lacuna no desenvolvimento de novos antibióticos é um fator fundamental que corrobora a problemática da resistência. Embora algumas novas moléculas tenham sido lançadas, o pipeline de antibióticos é notoriamente restrito quando comparado à velocidade de emergência e disseminação das resistências.

As estratégias terapêuticas convencionais encontram cada vez mais barreiras, mecanismos como bombas de efluxo, alterações na permeabilidade, produção de  $\beta$ -lactamases ou biofilmes tornam células bacterianas praticamente imunes a múltiplas classes de antibióticos. Esses múltiplos mecanismos são frequentemente combinados em cepas multirresistentes, sugerindo que estamos diante de um esgotamento progressivo das opções terapêuticas se não houver inovação e uso responsável das existentes (ELSHOBARY et al., 2025).

Os oceanos possuem uma vasta biodiversidade, com potencial para a descoberta de novos compostos bioativos. Organismos marinhos, como cnidários, equinodermos, moluscos e peixes,

possuem mecanismos de defesa contra predadores que envolvem a produção de toxinas, além de compostos bioativos para manutenção da espécie e garantia do animal em ambientes, muitas vezes, hostil. Assim, não é incomum se encontrar moléculas de organismos marinhos com atividade antimicrobiana, muitas vezes eficazes contra bactérias patogênicas a seres humanos. Nesse contexto, as toxinas marinhas se destacam por sua capacidade de interferir com a integridade das membranas celulares bacterianas, promovendo a morte celular e inibindo o crescimento bacteriano (FELÍCIO; OLIVEIRA; DEBONSI, 2012).

Além da biodiversidade marinha, os organismos marinhos são capazes de produzir uma ampla variedade de toxinas e moléculas bioativas, com estruturas moleculares únicas e mecanismo de ação ainda não explorados. Alguns compostos possuem atividade antimicrobiana geral, enquanto outros podem ser específicos para determinados tipos de bactérias ou até mesmo para biofilmes bacterianos, que são estruturas protetoras formadas por bactérias em superfícies. A capacidade de algumas toxinas marinhas de mitigar biofilmes representa um avanço significativo, pois essas estruturas estão frequentemente associadas à resistência bacteriana em ambientes hospitalares (AYDOS, 2016).

Além das propriedades antimicrobianas, já foram descritas moléculas marinhas com atividade anti-inflamatória e imunomoduladora, o que amplia seu potencial terapêutico. Essas propriedades podem ser extremamente úteis no tratamento de infecções bacterianas, não apenas ajudando a eliminar as bactérias, mas também auxiliando no controle da resposta imunológica, que muitas vezes acompanha as infecções. O uso de toxinas com múltiplas funções terapêuticas pode, portanto, oferecer uma abordagem mais eficaz e integrada no enfrentamento a infecções complexas (SILVA, 2015).

Entre as várias classes de compostos bioativos encontrados em organismos marinhos, os peptídeos antimicrobianos têm atraído especial atenção. Esses peptídeos são geralmente curtos e com propriedades hidrofóbicas ou anfipáticas, capazes de interagir com as membranas celulares bacterianas, causando desestabilização e levando à morte celular. A vantagem desses peptídeos sobre os antibióticos convencionais é sua capacidade de interagir mecanismos bacterianos específicos, dificultando o desenvolvimento de resistência. (LIMA, 2022).

Vários compostos naturais derivados de organismos marinhos têm sido investigados pelas suas propriedades antimicrobianas. Por exemplo, peptídeos antimicrobianos (AMPs) extraídos de

invertebrados marinhos, como esponjas e moluscos, demonstraram atividade contra uma variedade de patógenos multirresistentes. Esses AMPs atuam através de mecanismos distintos, incluindo desestabilização de membranas celulares bacterianas, inibição da formação de biofilme e modulação de respostas imunes, tornando-os candidatos promissores para terapias alternativas (SILVA et al., 2023).

Em geral, espécies de anêmonas-do-mar possuem um veneno rico em peptídeos. Alguns deles com atividade antimicrobiana foram descritos, como a equinina da *Actinia equina*, com atividade sobre bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, e com estrutura semelhante aos peptídeos antimicrobianos de anfíbios (LA CORTE et al., 2024).

Um peptídeo semelhante a uma defensina, o Ueq 12-1, foi isolado da anêmona-do-mar *Urticina eques* e inibiu o crescimento das linhagens Gram-negativas *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*, e das linhagens Gram-positivas *Staphylococcus aureus* e *Corynebacterium glutamicum*. Estruturas semelhantes a defensinas também foram encontradas no transcriptoma de outras espécies de anêmonas-do-mar, como a *Heteractis crista* (GUO et al., 2024; LOGASHINA et al., 2017).

Kvvetkina et al. (2021) demonstraram que o extrato aquoso das anêmonas-do-mar *Corallimorphus cf. pilatus* e *Stomphia coccinea* possui atividade antimicrobiana e antifúngica contra as bactérias Gram-positivas *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, e a levedura *Candida albicans*.

A *Anthopleura cascaia* é uma espécie de cnidário marinho que habita as águas costeiras tropicais e subtropicais, particularmente nas regiões do Atlântico Sul, como a costa do Brasil. Assim como outras espécies do filo Cnidaria, a *Anthopleura cascaia* possui células especializadas, os cnidócitos, que contêm organelas chamadas nematocistos, responsáveis pela liberação de substâncias tóxicas em resposta ao estímulo de predadores ou presas. Essas toxinas têm atraído crescente interesse científico devido às suas potenciais aplicações terapêuticas, especialmente no enfrentamento a patógenos bacterianos e fúngicos (JOUIAEI et al., 2015).

As substâncias bioativas presentes na *Anthopleura cascaia* podem atuar como potentes agentes antimicrobianos, com atividades que incluem a inibição da multiplicação de bactérias patogênicas, como *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*, comumente responsáveis por

infecções em ambientes clínicos e hospitalares. Estudos recentes sobre as propriedades químicas e biológicas de suas toxinas indicam a presença de peptídeos com mecanismos de ação que desestabilizam as membranas celulares de microrganismos, tornando-os suscetíveis à morte celular, e promovendo uma abordagem inovadora para a luta contra a resistência bacteriana (HAN et al., 2020; SANTANA et al., 2012).

Além das propriedades antimicrobianas, *Anthopleura cascaia* possui uma riqueza de compostos com potenciais propriedades anticancerígenas e anti-inflamatórias, o que abre novas perspectivas no desenvolvimento de tratamentos para diversas condições patológicas. A exploração de toxinas de cnidários, incluindo *Anthopleura cascaia*, pode representar um avanço significativo em áreas como farmacologia, medicina regenerativa e biotecnologia (MARIOTTINI; PANE, 2013).

Diante deste cenário, pesquisas voltadas à descoberta e caracterização de compostos antimicrobianos provenientes de organismos marinhos são essenciais. O desenvolvimento de terapias baseadas em toxinas e peptídeos marinhos representa uma oportunidade científica e uma necessidade urgente de saúde pública, oferecendo alternativas mais eficazes, menos propensas à resistência e capazes de reduzir o impacto das infecções nosocomiais causadas por bactérias multirresistentes. Assim, neste trabalho avaliamos a atividade antimicrobiana dos venenos de anêmonas do mar contra bactérias multirresistentes, de cepas com poucas opções terapêuticas (GUO et al., 2024).

## 2. OBJETIVOS

**2.1. Objetivo geral:** Este estudo tem como objetivo investigar a ação antimicrobiana de compostos extraídos de anêmonas-do-mar, avaliando sua eficácia contra bactérias multirresistentes.

**2.1. Objetivos específicos:** Obter o veneno de três espécies de anêmonas-do-mar - *Anthopleura cascaia*, *Exaiptasia pallida* e *Bunodosoma cangicum* - e testá-los para verificar, por meio de um screening, o mais eficaz na inibição do crescimento de bactérias multiresistentes, de diferentes cepas; Selecionar uma molécula ativa pelo fracionamento guiado pela atividade antibacteriana da cepa com melhor atividade antibacteriana; e Avaliar o efeito da molécula isolada em ensaios antibacterianos em microdiluição e biocida.

**CAPÍTULO 1: submetido.**

**Título do artigo:** Tetrabutylammonium isolated from *Anthopleura cascaia* sea anemone venom has antimicrobial activity against multiresistant *Klebsiella pneumoniae*".

Artigo submetido a revista Antimicrobial Agents and Chemotherapy, contendo os resultados do trabalho desenvolvido ao longo do mestrado. O artigo traz o teste de 3 espécies de anêmonas-do-mar em 6 diferentes cepas de bactérias de isolados clínicos, com a seleção de uma espécie de anêmona (*Anthopleura cascaia*) e uma cepa de bactéria *Klebsiella pneumoniae*, em que foram observados melhores efeitos antibacterianos. A partir disso, foi isolada uma molécula ativa, caracterizada como tetrabutílamônio. Essa molécula foi obtida comercialmente, e testada em diferentes cepas de *Klebsiella pneumoniae*, com diferentes perfis de resistência. Foi observada importante atividade em algumas cepas, tanto em um ensaio de inibição do crescimento de bactérias por microdiluição, mas principalmente em um ensaio biocida.

# Tetrabutylammonium isolated from *Anthopleura cascaia* sea anemone venom has antimicrobial activity against multiresistant *Klebsiella pneumoniae*

Clara Brito Alves <sup>1</sup>, Leonardo Pereira de Lima <sup>1</sup>, Natália Conceição Rocha <sup>2</sup>, Emídio Beraldo-Neto <sup>3</sup>, Thiago Rojas Converso <sup>2</sup>, Raquel Girardello <sup>2</sup>, Juliana Mozer Sciani <sup>\*</sup>

<sup>1</sup> Laboratório de Produtos Naturais, Universidade São Francisco, Bragança Paulista 12916-900, Brazil;

<sup>2</sup> Laboratório de Microbiologia Molecular e Clínica, Universidade São Francisco, Bragança Paulista 12916-900, Brazil.

<sup>3</sup> Laboratório de Bioquímica e Biofísica, Instituto Butantan, São Paulo 05503-900, Brazil.

\* Correspondence: juliana.sciani@usf.edu.br

## Abstract

The increase in bacterial resistance has been frequently observed in clinics, making the search for new antimicrobial agents necessary. For this purpose, marine animals are a rich source of bioactive molecules, which can be discovered as their potential antimicrobial effects. This study evaluates the antimicrobial properties of compounds extracted from sea anemone venoms, assessing their efficacy against multidrug-resistant strains of bacteria *Acinetobacter baumannii*, *Escherichia coli*, and *Klebsiella pneumoniae*, through an antibacterial activity-guided fractionation. An inhibition halo in a disc-diffusion assay was observed with *Anthopleura cascaia* venom on a clinical isolate of *K. pneumoniae*. Subsequently, the venom was fractionated by HPLC, and the fractions were submitted to a microdilution assay at several concentrations to select the active compound. We were then able to obtain a pure active molecule, which was characterized by mass spectrometry, and identified as tetrabutylammonium (TBA). The synthetic TBA was tested against several resistant clinical isolates of *K. pneumoniae*, where different effects among them were observed. The most affected strains were tested for biocidal assay, which showed a more potent effect against three clinical isolates that had no remaining therapeutic options. Although TBA is a known compound, its presence in a sea anemone has never been reported. Moreover, its antibacterial activity on clinical multiresistant strain of *K. pneumoniae* is a novel finding with high potential for therapeutic applications in combating infections resistant to conventional antibiotics, supporting the development of alternatives based on natural marine products.

**Keywords:** *Marine toxins. Klebsiella pneumoniae. Antibacterial Drug Resistance. Cnidarian Venoms.*

## 1. Introduction

Bacterial resistance is one of the greatest challenges in public health. The widespread and indiscriminate use of antibiotics has intensified this problem by activating resistance mechanisms in bacteria, making them multidrug-resistant (MDR) strains that no longer respond to conventional antibiotic treatment. Thus, the current therapy becomes ineffective. This phenomenon highlights the urgent need for new therapeutic options, and in this context, natural compounds from marine organisms are emerging as a promising source of new molecules, including antimicrobial agents [1].

The oceans have a vast biodiversity, and have already provided a wide range of bioactive molecules, particularly from animals, and many of them used in clinics for the treatment of several diseases. These organisms have developed defense mechanisms that include the production of toxins and bioactive molecules, effective against human pathologies, including bacterial infection. Such molecules have demonstrated the ability to disrupt bacterial membrane integrity, promoting cell death and consequently inhibiting microbial growth [2].

Among bioactive compounds from marine organisms, antimicrobial peptides have received special attention. They are amphiphilic and able to interact with membranes, to destabilize them. However, many of them have a broad-spectrum activity, showing low selectivity, but on the other hand the possibility to act on different types of multidrug-resistant bacteria. In addition, it has already been described that marine molecules can act against bacterial biofilms, reinforcing their therapeutic potential [3].

In general, sea anemone species have a venom rich in peptides. It has been described some of them with antimicrobial activity, such as equinin from *Actinia equina*, with activity on Gram+ and Gram-bacteria, and with similar structure than antimicrobial peptides from amphibians [4]. A peptide similar to defensin, Ueq 12-1, was isolated from the sea anemone *Urticina eques* and inhibited the growth of Gram-negative strains *E. coli* and *P. aeruginosa*, and Gram-positive strains *S. aureus* and *C. glutamicum* [5]. Defensin-similar structures were also found in the transcriptome of other sea anemones species, such as *Heteractis crispa* [6]. Kvvetskina et al. showed that the aqueous extract of *C. cf. pilatus* and *Stomphia coccinea* sea anemones have antimicrobial and antifungal activity against Gram-positive bacteria *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, and yeast *Candida albicans* [7].

*Anthopleura cascaia* sea anemone also has bioactive molecules with potential therapeutic properties. This species possesses cnidocytes that release toxins in response to predators or prey. These toxins are composed of proteins, peptides providing a natural source of peptides capable of destabilizing the membranes of microorganisms such as *Acinetobacter baumannii* and *Klebsiella pneumoniae*, bacteria often associated with hospital-acquired infections. Studying these toxins allows the exploration of new therapeutic approaches to address the growing issue of bacterial resistance, expanding the strategies available for treating complex infections [8].

Given this scenario, research focused on the discovery and characterization of antimicrobial compounds from marine organisms is essential. The development of therapies based on marine toxins and peptides represents both a scientific opportunity and an urgent public health need, offering more effective alternatives that are less prone to resistance, and capable of reducing the impact of nosocomial infections caused by multidrug-resistant bacteria [6].

Various natural compounds derived from marine organisms have been investigated for their antimicrobial properties. For example, antimicrobial peptides (AMPs) extracted from marine invertebrates, such as sponges and mollusks, have shown activity against a variety of multidrug-resistant pathogens. These AMPs act via distinct mechanisms, including destabilization of bacterial cell membranes, inhibition of biofilm formation, and modulation of immune responses, making them promising candidates for alternative therapies [7].

Additionally, compounds derived from marine sponges, such as *Neopetrosia exigua*, have demonstrated significant antimicrobial activity. Studies showed that fractions extracted from this sponge, especially those obtained with nonpolar solvents such as hexane and dichloromethane, contain bioactive compounds that inhibit the growth of bacteria such as *Staphylococcus aureus* [8].

Thus, in this work, we evaluate the antimicrobial activity of sea anemones venoms against multi-resistant bacteria, from strains with few therapeutic options.

## 2. Materials and Methods

### 2.1. Material

Tetrabutylammonium bisulfate, 99,62% was purchased from Neon Reagentes Analíticos, Brazil. Other reagents were obtained from Sigma-Aldrich, unless specified.

### 2.1. Animal and venom attainment

Sea anemone specimens were collected in São Sebastião, SP, under an ICMBio permit (number 93947-2). After collecting, the animals were immersed in an aqueous solution containing 0.1% acetic acid and methanol to discharge nematocysts and release venom. The secreted material was then centrifuged at 10000 rpm for 10 minutes and the supernatant lyophilized for subsequent use in assays.

### 2.2. Fractioning and characterization

The obtained venom was subjected to high-performance liquid chromatography (HPLC) using a C18 column (Supelco, 4.6 × 250 mm, 5 µm). Elution was performed with a gradient of acetonitrile (0 to 90%, in a solution containing 0.1% TFA) over 35 minutes at a flow rate of 1 mL/min. Peaks were monitored at 214 nm, collected manually, lyophilized, and resuspended in ultrapure water for antimicrobial analyses.

The fraction with the highest activity was characterized by mass spectrometry (ESI-IT-ToF, Shimadzu Co, Japan) in an analysis conducted in both positive and negative modes over a range of 50–1000 m/z, in a data acquisition performed by the LC Solutions software. The ion of interest was fragmented by collision with argon gas to obtain an MS/MS profile. mzML file was compared to natural products database (with scientific community check) using the GNPS-MassIVE platform for untargeted MS2 and compound identification by molecular network and spectral similarity ([//gnps.ucsd.edu](http://gnps.ucsd.edu)). The parameters were set in 0,5 Da for precursor ions, 0,2 Da for fragment ions, combined peak of 6 min and threshold of 0,7 [9].

### 2.3. Antimicrobial activity

The antimicrobial activity of sea anemones venom and fractions was evaluated against multidrug-resistant bacterial isolates obtained from the HUSF patients or clinical derived strains, obtained under ethical approval (CAAE 44416021.3.0000.5514). The strains are stocked in the microorganism's bank of Microbiology Laboratory from USF. Initial screening was performed to identify the active sea anemone venom against *Staphylococcus aureus*, *Coagulase-negative Staphylococcus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, and *Enterococcus faecalis*. One sea anemone venom and one bacterial strain were selected for the study, as follows.

The selection criteria for strains and clinical isolates for the study were those with the highest rates of virulence and resistance, according to data available in the biobank of the Microbiology Laboratory at Universidade São Francisco. All belonging to the genus *Klebsiella*, chosen for their clinical importance and the potential to consistently represent challenges related to bacterial resistance.

#### 2.3.1. Disk diffusion susceptibility test

The test was conducted on Mueller-Hinton agar plates to evaluate the antibacterial potential of the samples. Bacterial strains were cultivated on solid agar at 37 °C for 24 hours, and a standardized inoculum equivalent to 0.5 McFarland ( $\sim 1-5 \times 10^8$  CFU/mL) was spread evenly onto the agar surface. Sterile paper disks were loaded with 10  $\mu$ L of sea anemone venoms at a concentration of 10 mg/mL and placed on the inoculated plates. Plates were incubated at 37 °C for 24 hours and then observed to check inhibition halos around the disk embedded with the sample. Venoms demonstrating consistent antibacterial activity and the responsive bacterial strains were selected for further fractionation and evaluation by broth microdilution assays.

### 2.3.2. Broth Microdilution

Samples were tested using the broth microdilution method, in 96-well plates. Samples were diluted in 200  $\mu$ L of Mueller-Hinton broth and added to wells containing Mueller-Hinton broth. Serial dilutions were performed across the plate, including control wells containing only broth (negative control) and wells with bacteria but without treatment (positive growth control).

Bacterial inoculums were prepared by selecting a colony from Mueller-Hinton agar plate, resuspending it in sterile saline to 0.5 McFarland turbidity, diluted 10X to Mueller-Hinton broth, and then 100  $\mu$ L was added to each well. Plates were incubated at 37 °C for 24 hours. Bacterial growth was assessed by measuring absorbance at 600 nm using a microplate reader (Glomax Multidetector, Promega). Antimicrobial activity was calculated by comparing absorbance values of treated wells to values from negative and positive control. All experiments were conducted in triplicate to ensure reproducibility and statistical reliability.

### 2.3.3. Biocide

For the biocidal assay, bacterial clinical isolates that showed best performances in microdilution test were selected to further investigate their antimicrobial activity by biocide assay. A colony from a plate bacterial inoculum was selected and diluted in sterile saline solution until 0.5 McFarland turbidity. This inoculum (10  $\mu$ L) was incubated to the sample (100, 750, and 2000  $\mu$ g/mL), for 15 minutes, and then added to the Petri dishes containing Mueller-Hinton agar. A negative control plate, without the compound, was included for comparison. Plates were incubated at 37 °C for 24 hours, and bacterial growth was analyzed by visual inspection and colony counting.

### 2.3.4. Toxicity

The toxicity of Tetrabutylammonium was predicted using ProTox 3.0 - Prediction Of Toxicity Of Chemicals. The structure of the molecule was inserted as its SMILES (CCCC[N+](CCCC)(CCCC)CCCC.[O-]S(=O)(=O)[O-]), according to the Pubchem. The report containing the potential toxicity was generated, with default parameters.

## 3. Results

### 3.1. Disc-diffusion test of sea anemone extracts in different clinical isolates

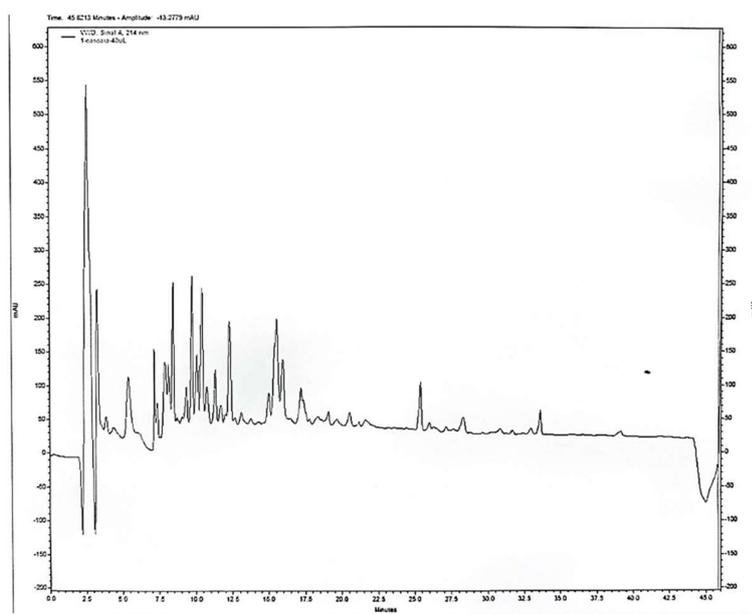
We initially employed the disk diffusion method to evaluate the antibacterial effects of sea anemones venoms against multidrug resistant bacterial strains from the USF collection. Inhibition zones could be visually assessed with the incubation of the 3 marine species, each one for one different bacterial strain, as shown in Table 1, which indicates the presence (+) or absence (-) of inhibition halo. Based on these results, *Anthopleura cascaia* was prioritized for additional assays against *Klebsiella pneumoniae*, given its significant activity, and the availability of different clinical isolates corresponding to this strain, which has fewer therapeutic options.

**Table 1.** Disk diffusion assay of marine extracts against multidrug-resistant bacteria, from clinical isolates.

|                            | S.<br><i>aureus</i> | E.<br><i>faecalis</i> | E.<br><i>coli</i> | CNS | A.<br><i>baumanii</i> | E.<br><i>faecium</i> | K.<br><i>pneumoniae</i> |
|----------------------------|---------------------|-----------------------|-------------------|-----|-----------------------|----------------------|-------------------------|
| <i>Exaiptasia pallida</i>  | -                   | -                     | +                 | -   | -                     | -                    | -                       |
| <i>Anthopleura cascaia</i> | -                   | -                     | -                 | -   | +                     | -                    | +                       |
| <i>Bunodosoma cangicum</i> | -                   | -                     | +                 | -   | -                     | -                    | -                       |

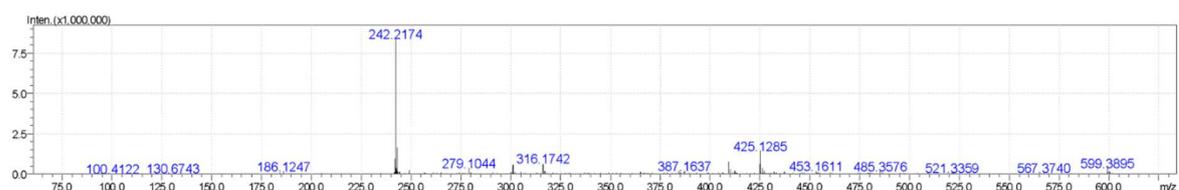
### 3.2. Fractionation of *A. cascaia* venom

A fractionation of *A. cascaia* extract was performed by HPLC, yielding 20 fractions (Figure 1). Fractions were tested in another antimicrobial assay, the broth microdilution with *Klebsiella pneumoniae*, in which several concentrations of samples could be tested. One fraction, named AC15 (in the arrow in Figure 1), exhibited activity at an initial concentration of 100 µg/mL - an inhibition of 39.85 ± 3.72%.



**Figure 1.** HPLC chromatogram of *Anthopleura cascaia* venom showing multiple peaks corresponding to different constituents of the sample.

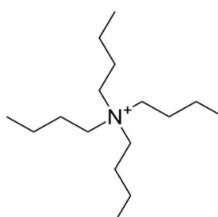
The active fraction (AC15) was analyzed by mass spectrometry and a unique ion, indicating high purity of the sample (Figure 2A). The ion 242 m/z was selected and fragmented (Figure 2B), revealing a fragmentation profile consistent with tetrabutylammonium (Figure 2C), as indicated by GNPS and manually checked.



(a)



(b)



(c)

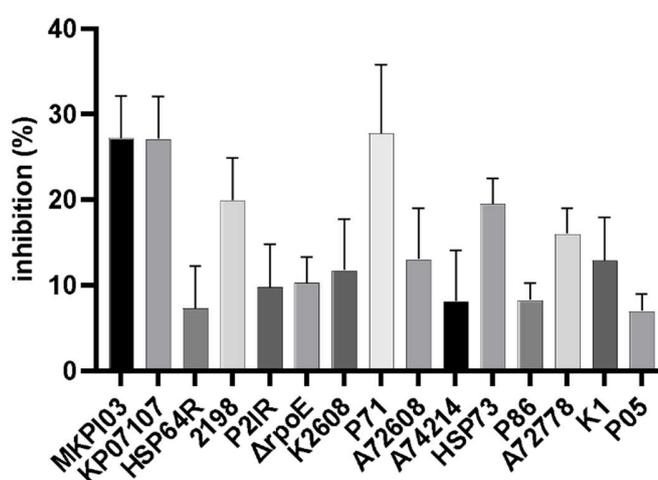
**Figure 2.** Analysis of the peak with antimicrobial activity, collected after chromatography of *Anthopleura cascaia* venom. (a) Mass spectrum of MS profile, in full scan of 50-700 m/z. (b) Fragmentation of the 242 m/z ion and MS/MS spectra. (c) Chemical structure of tetrabutylammonium (TBA), identified from the mass spectra.

### 3.3. Microdilution test of tetrabutylammonium

To confirm the antimicrobial activity, synthetic TBA was submitted to the same broth microdilution test. It was possible to observe that TBA reproduced the effects of the natural molecule, confirming its identity. Subsequently, several clinically resistant *K. pneumoniae* isolates were tested using the synthetic TBA. Figure 3 shows the highest percentage of bacterial inhibition growth of TBA, compared to its respective control (bacteria without TBA). Overall, it was observed that there was a moderate variability

among clinical isolates, with reductions ranging from 5% to 27%. The highest inhibition observed in clinical isolates was for P71 (28%), followed by HSP73 and 2198 (20%). Lower effects were noticed in A74214 and P86 (8%), HSP64R and P05 (7%), and 2.3 (5%). Among clinical derived strain, reduction of 27% was observed with both MKPI03 and KP07107.

In table 2, there is information about each strain or clinical isolate analyzed, characteristics of each one and the resistant profile.



**Figure 3.** Percentage of antimicrobial activity against different *Klebsiella pneumoniae* strains assessed by the microdilution assay, related to their positive control, bacteria without any treatment

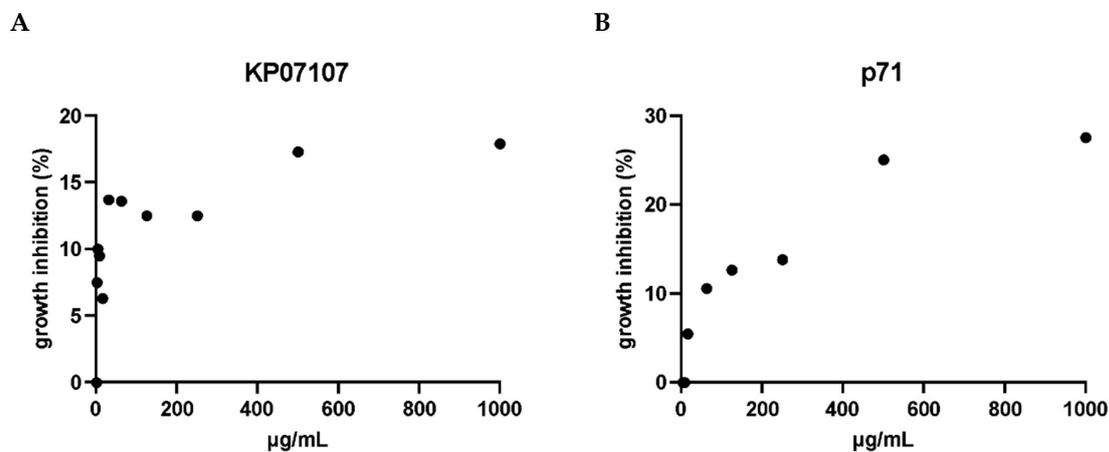
**Table 2.** Information about each strain or clinical isolate of *Klebsiella pneumoniae* analyzed in broth microdilution assay, their characteristics and the resistant profile.

| Isolate ID   | Origin / Source          | Characteristics  | Resistance Profile        |
|--------------|--------------------------|--|---------------------------|
| MPK103       | Clinical derived strain  | -  | Chloramphenicol resistant |
| KP07107      | Clinical derived strain  | Non-capsular strain ( <i>wza</i> negative) derived from MKP103 | Chloramphenicol resistant |
| HSP64R       | Clinical isolate         | Multidrug-resistant  | SHV, KPC, TEM, CTX-M      |
| 2198         | Clinical isolate         | Reference strain   | Not specified             |
| P2IR         | Clinical isolate         | Multidrug-resistant  | SHV, TEM                  |
| ΔrhoE        | Mutant laboratory strain | Sigma factor deletion mutant                                   | None reported             |
| 2608 (K2608) | Clinical isolate         | Reference strain   | Not specified             |
| P71          | Clinical isolate         | Multidrug-resistant  | Resistant to polymyxin B  |
| A72608       | Clinical isolate         | Multidrug-resistant  | Resistant to polymyxin B  |

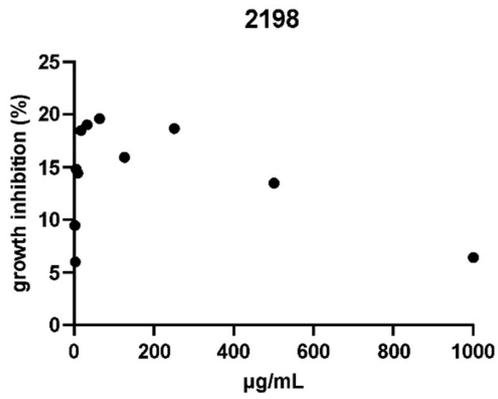
|        |                   |                                     |                                      |
|--------|-------------------|-------------------------------------|--------------------------------------|
| A74214 | Clinical isolate  | Multidrug-resistant                 | Resistant to polymyxin B             |
| HSP73  | Clinical isolate  | Multidrug-resistant                 | Carbapenem and polymyxin B resistant |
| P86    | Clinical isolate  | Multidrug-resistant                 | Carbapenem and polymyxin B resistant |
| A72778 | Clinical isolate  | Multidrug-resistant                 | Carbapenem and polymyxin B resistant |
| K1     | Laboratory strain | Hypervirulent, capsular serotype K1 | Not specified                        |
| P05    | Clinical isolate  | Multidrug-resistant                 | Carbapenem resistant                 |

When we analyzed the concentration-response curve with the clinical isolates with the most intense activity, it was possible to observe that TBA reduced the bacterial growth in a concentration-response effect for P71, HSP73 and KP07107 (Figure 4A, 4B and 4E). The action of TBA in 2198 and MPKI03 had a response with low TBA concentration (Figures 4C and 4D).

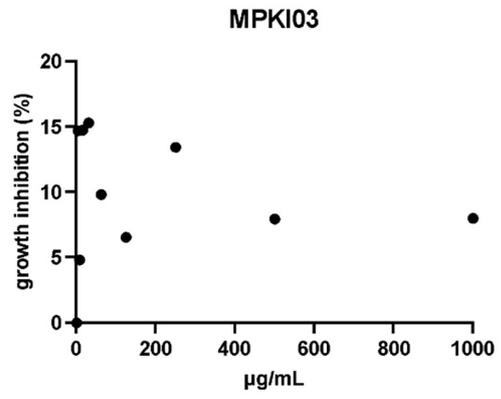
These two clinical isolates (2198 and MPKI03) were re-analyzed in the same assay, in a lower range of TBA concentration, and a better response, with correlation to the concentration, could be now observed (Figures 5A and 5B).



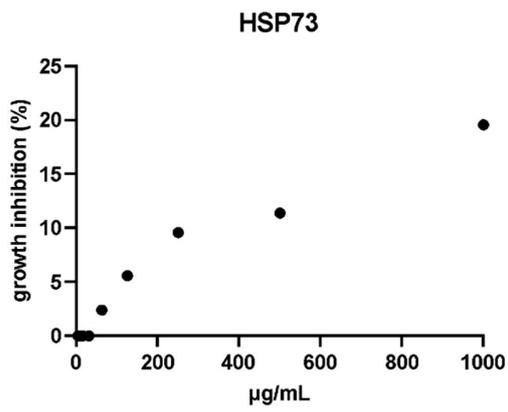
C



D

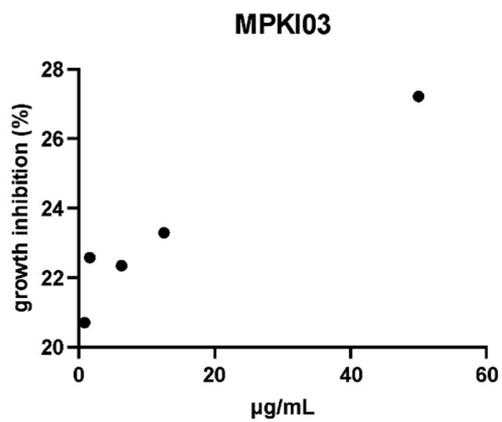


E

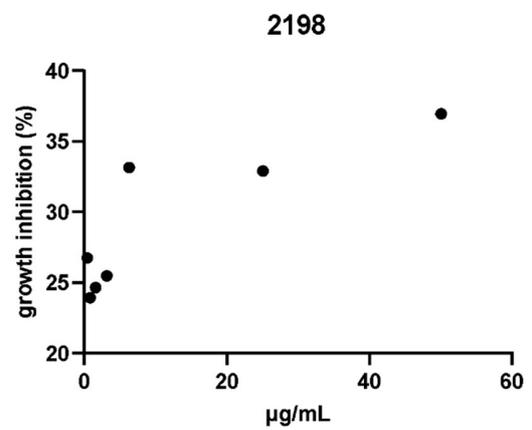


**Figure 4.** Concentration-response curve of tetrabutylammonium (TBA) against *Klebsiella pneumoniae* growth, in the broth microdilution assay.

A



B

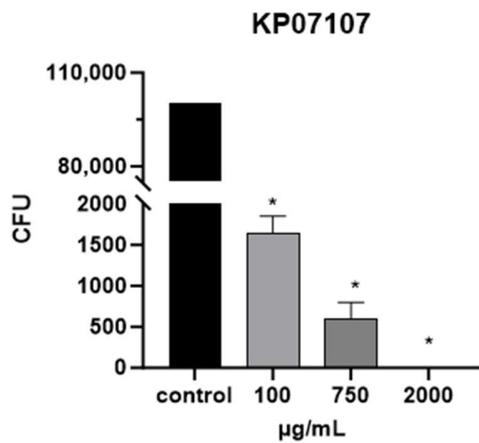


**Figure 5.** Concentration-response curve of tetrabutylammonium (TBA) against *Klebsiella pneumoniae* growth, in the broth microdilution assay, in a lower range of concentration.

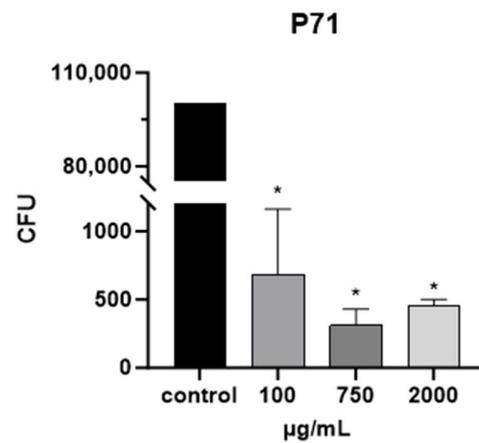
### 3.4. Biocide test of TBA in different clinical isolates of *K. pneumoniae*

The synthetic TBA (2000, 750 and 100  $\mu\text{g/mL}$ ) was then tested in the biocidal assay, using the clinical isolate the best performed in microdilution assay. In this assay, a significant antimicrobial effect was observed with TBA incubation, where it was possible to observe an almost complete absence of KP07107 *K. pneumoniae* bacterial colonies, compared to the untreated control (>100,000 CFU) (Figure 6A). A similar effect was observed in other clinical isolates, that, although they presented colonies, the CFU was lower compared to the control. P71 has a concentration-effect similar to the microdilution test (Figure 6B), where 2198 and MKPI03 had a similar profile to the microdilution test, a better activity with an intermediary concentration (Figures 6C and D, respectively).

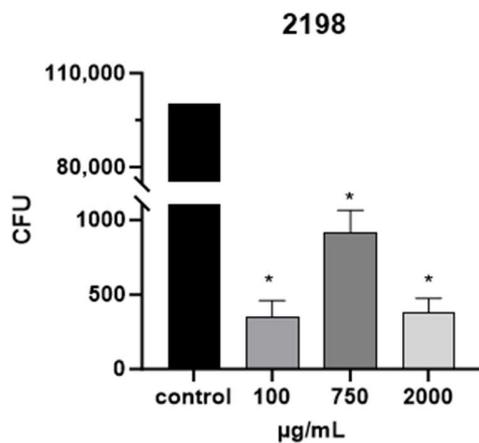
A



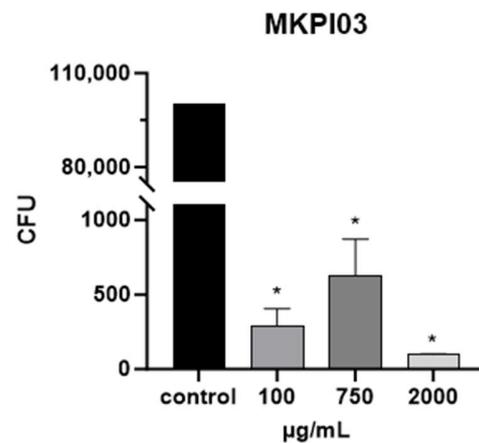
B



C



D



**Figure 6.** Biocidal assay performed with the incubation of different concentrations of tetrabutylammonium (TBA) (100, 750 and 2000 µg/mL) with clinical isolates of: A) KP07107; B) P71; C) 2198; D) MPKI03. Data are presented as mean ± standard deviation (SD). Statistical analysis was performed using a non-parametric test, with  $p < 0.05$  considered statistically significant.

### 3.5. Toxicity

The predicted toxicity was calculated as class 3, with LD50 180 mg/kg. Moreover, the points of attention were regarding ecotoxicity and the possibility to disrupt the brain-blood barrier, but other organs or targets were not considered toxic (Table 2).

**Table 3.** Predicted toxicity of TBA.

| Target  | Shorthand     | Prediction | Probability |
|---|---------------|------------|-------------|
| Hepatotoxicity  | dili          | Inactive   | 0,82        |
| Neurotoxicity   | neuro         | Inactive   | 0,74        |
| Nephrotoxicity  | nephro        | Inactive   | 0,61        |
| Respiratory toxicity  | respi         | Active     | 0,51        |
| Cardiotoxicity  | cardio        | Inactive   | 0,77        |
| Carcinogenicity   | carcino       | Inactive   | 0,72        |
| Immunotoxicity  | immuno        | Inactive   | 0,94        |
| Mutagenicity  | mutagen       | Inactive   | 0,56        |
| Cytotoxicity  | cyto          | Inactive   | 0,65        |
| BBB-barrier   | bbb           | Active     | 0,83        |
| Ecotoxicity   | eco           | Active     | 0,71        |
| Clinical toxicity   | clinical      | Inactive   | 0,83        |
| Nutritional toxicity  | nutri         | Inactive   | 0,57        |
| Aryl hydrocarbon Receptor (AhR)   | nr_ahr        | Inactive   | 0,99        |
| Androgen Receptor (AR)  | nr_ar         | Inactive   | 1           |
| Androgen Receptor Ligand Binding Domain (AR-LBD)                                      | nr_ar_lbd     | Inactive   | 0,99        |
| Aromatase   | nr_aromatase  | Inactive   | 0,97        |
| Estrogen Receptor Alpha (ER)  | nr_er         | Inactive   | 0,89        |
| Estrogen Receptor Ligand Binding Domain (ER-LBD)                                      | nr_er_lbd     | Inactive   | 0,94        |
| Peroxisome Proliferator Activated Receptor Gamma (PPAR-Gamma)                         | nr_ppar_gamma | Inactive   | 0,99        |
| Nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2/antioxidant responsive element (nrf2/ARE) | sr_are        | Inactive   | 0,96        |
| Heat shock factor response element (HSE)  | sr_hse        | Inactive   | 0,96        |
| Mitochondrial Membrane Potential (MMP)  | sr_mmp        | Inactive   | 0,69        |
| Phosphoprotein (Tumor Suppressor) p53   | sr_p53        | Inactive   | 0,97        |
| ATPase family AAA domain-containing protein 5 (ATAD5)                                 | sr_atad5      | Inactive   | 0,98        |
| Thyroid hormone receptor alpha (THR $\alpha$ )  | mie_thr_alpha | Inactive   | 0,65        |
| Thyroid hormone receptor beta (THR $\beta$ )  | mie_thr_beta  | Inactive   | 0,72        |
| Transthyretin (TTR)   | mie_ttr       | Inactive   | 0,91        |

|  |            |          |      |
|--|------------|----------|------|
| Ryanodine receptor (RYR)   | mie_ryr    | Inactive | 0,90 |
| GABA receptor (GABAR)  | mie_gabar  | Inactive | 0,85 |
| Glutamate N-methyl-D-aspartate receptor (NMDAR)<br>alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionate<br>receptor (AMPA) | mie_nmdar  | Inactive | 0,91 |
| Kainate receptor (KAR)   | mie_kar    | Inactive | 0,99 |
| Achetylcholinesterase (AChE)   | mie_ache   | Inactive | 0,73 |
| Constitutive androstane receptor (CAR)   | mie_car    | Inactive | 0,99 |
| Pregnane X receptor (PXR)  | mie_pxr    | Inactive | 0,61 |
| NADH-quinone oxidoreductase (NADHOX)   | mie_nadhox | Inactive | 0,64 |
| Voltage gated sodium channel (VGSC)  | mie_vgsc   | Inactive | 0,83 |
| Na <sup>+</sup> /I <sup>-</sup> symporter (NIS)  | mie_nis    | Inactive | 0,97 |
| Cytochrome CYP1A2  | CYP1A2     | Inactive | 0,93 |
| Cytochrome CYP2C19   | CYP2C19    | Inactive | 0,84 |
| Cytochrome CYP2C9  | CYP2C9     | Inactive | 0,68 |
| Cytochrome CYP2D6  | CYP2D6     | Inactive | 0,66 |
| Cytochrome CYP3A4  | CYP3A4     | Inactive | 0,95 |
| Cytochrome CYP2E1  | CYP2E1     | Inactive | 0,90 |

#### 4. Discussion

The present study investigated the antimicrobial potential of extracts from sea anemones, focusing on its efficacy against multidrug-resistant bacterial strains. Our initial screening using the disk diffusion method revealed that *Anthopleura cascaia* extract exhibited antimicrobial activity against *Acinetobacter baumannii* and *Klebsiella pneumoniae*, which was chosen for further evaluation, due to a wide repertoire of this multi-resistant strain in our biobank, with several resistant profiles.

The fractionation of the *A. cascaia* extract via HPLC led to the isolation of an active compound, identified as tetrabutylammonium (TBA) through mass spectrometry. The validation of its activity using a commercially available synthetic form of TBA strengthens the reliability of our identification. TBA is a quaternary ammonium compound frequently used as a cocatalyst in several chemical reactions, such as alkylation, oxidation, reduction, and esterification processes, and facilitating reactions between immiscible aqueous and organic phases due to its zwitterionic capacity [10]. TBA has never been described in a marine animal, or related to the biosynthesis of other compounds. Therefore, its presence in the *A. cascaia* extract can be due to an accumulation from a contaminant source, such as effluents, ships and so on.

Quaternary ammonium compounds (QACs) are widely recognized for their antimicrobial properties. Despite that, in this study, we saw that TBA was highly selective, being active on *K. pneumoniae*, and few strains or clinical isolates. Specific antibacterial activity of TBA against multidrug-resistant clinical strains, particularly *K. pneumoniae*, had not been reported [11].

Extensive use of QACs raises environmental concerns, particularly regarding toxicity to aquatic organisms and their contribution to antimicrobial resistance. Research suggests that the presence of QACs in aquatic environments can negatively affect biodiversity and promote the selection of resistant bacterial strains [12]. On the other hand, TBA seems not to be toxic for *A. cascaia* sea anemone. For humans, according

to the prediction of ToxPred software, the LD50 is high, in a class 3, and with possible toxic effects in few organs and targets.

Studies show that QACs act by disrupting bacterial cell membranes, leading to cell death. The efficacy of QACs may vary with the chemical structure of the compound and the type of target microorganism [13].

The antimicrobial efficacy of TBA can be influenced by the counter-ion structure. Ingalsbe et al. evaluated a library of counter anion of TBA against *S. epidermidis* and *E. coli*, and showed different antimicrobial activity among them - the bisulfate TBA presented intermediary antimicrobial activity for both strains [11].

We have clearly seen this variation, as TBA had different activities in different clinic isolates of *K. pneumoniae*, confirming its selectivity among multidrug-resistant strains. TBA was active mostly on chloramphenicol, carbapenem and polymyxin B resistant clinical isolates. From chloramphenicol-resistant strains, it had activity on both capsular and non-capsular strain (*wza* negative). Moreover, activity was observed on reference strains, with no specific resistance profile, such as 2198.

The microdilution assays demonstrated that synthetic TBA exhibited moderate antimicrobial activity against a panel of clinically resistant *K. pneumoniae* strains, and some of them with concentration-response dependency. The observed range of bacterial reduction (5% to 27%) suggests that the susceptibility to TBA may vary depending on the specific genetic background or resistance mechanisms of different strains. This variability is a common challenge in antimicrobial drug development and necessitates further investigation into the mechanisms of action of the molecule.

Despite the moderate activity observed in microdilution, the biocidal assay was more evident, where TBA revealed a pronounced antimicrobial effect, leading to a significant reduction in bacterial growth or even complete growth inhibition. These results suggest that TBA might be more effective as an antiseptic bactericidal agent than antimicrobial drug.

Frolov et al (2022) showed that QACs, with bromide and chloride counterions, had antibacterial and biocidal activity in clinical strain of *K. pneumoniae*, being the octenidine dichloride compound a MIC of 2-4 mg/L (2-4 µg/mL), lower than we found here with TBA. However, the MIC was similar to reference strains, obtained from ATCC, and although it is a clinical strain, the authors did not mention if there is a resistance profile.

Antimicrobial activity of the TBA was significantly higher against the KP07107 strain, which was the most susceptible at the tested concentration in both assays. This strain is an acapsular mutant of the wild-type MPK103 strain, lacking the *wza* gene essential for capsular polysaccharide export. Importantly, the parental wild-type strain, MPK103, which expresses a complete capsule, also demonstrated considerable biocide activity, although to a lesser extent than its acapsular derivative. This suggests that the antimicrobial mechanism of action of the compound is primarily independent of the *Klebsiella pneumoniae* capsule as a necessary target, and the observed difference in susceptibility KP07107 > MPK103 is likely due to the capsule acting as a partial physical barrier that hinders access to the bacterial surface. Consistent with this interpretation, K1, a strain exhibiting a hypermucoviscous phenotype, showed a diminished susceptibility to the compound. This substantial reduction in activity is probably due to the highly expressed and voluminous capsular layer, which acts as a major barrier that severely impairs the ability of the ionic compound to permeate the mucus and interact with the cell surface.

On the other hand, P71 had an important antimicrobial effect, a clinical isolate from a patient, without a therapeutic option to treat infection, with characteristics of being multi-resistant, especially to polymyxin B. In addition, TBA had no effect on other clinical isolates, such as P2IR and HSP64R, that had similar origin and characteristics than P71. Thus, the mechanism of action is not only related to the capsule, but other bacterial features, including intracellular pathways.

Few studies have evaluated the antimicrobial activity of TBA. In several deep eutectic solvents formulations containing tetrabutylammonium bromide, antibacterial activity was observed against both Gram-negative and Gram-positive bacteria (*E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. aureus* and *L. monocytogenes*) [13]. It's important to highlight that most studies evaluate susceptible or laboratory derivative strains. In this study we observe activity against multidrug-resistant clinical isolates.

Future research focusing on elucidating the precise mechanism by which TBA exerts its antibacterial effects is essential for the development of a new antimicrobial agent. Furthermore, in vivo studies are important to assess its therapeutic efficacy, pharmacokinetics, and safety profile.

## 5. Conclusions

In conclusion, this study successfully isolated and identified tetrabutylammonium from *Anthopleura cascaia* sea anemone (being a synthesis product or bioaccumulated) as a compound with promising antimicrobial activity against multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae*. While the microdilution results showed moderate inhibition, the biocidal activity at higher concentrations highlights its potential as a bactericidal agent.

**Funding:** J.M.S is National Council for Scientific and Technological Development (CNPq) fellow (313402/2023-0).

**Institutional Review Board Statement:** The study was conducted in accordance with the Ethics Committee in Clinical Research (CAAE 44416021.3.0000.5514) for bacterial obtainment and the Brazilian environmental agency ICMBio (number 93947-2) for sea anemone collection.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflicts of interest.

## References

1. Abrantes, J.A.; Nogueira, J.M.D.R. Resistência Bacteriana Aos Antimicrobianos: Uma Revisão Das Principais Espécies Envolvidas Em Processos Infecciosos. *RBAC* 2022, 53, doi:10.21877/2448-3877.202102156.
2. Felício, R.D.; Oliveira, A.L.L.D.; Debonsi, H.M. Bioprospecção a Partir Dos Oceanos: Conectando a Descoberta de Novos Fármacos Aos Produtos Naturais Marinhos. *Cienc. Cult.* 2012, 64, 39–42, doi:10.21800/S0009-67252012000300013.
3. Magalhães, R.; Mil-Homens, D.; Cruz, S.; Oliveira, M. Marine Antimicrobial Peptides: Emerging Strategies Against Multidrug-Resistant and Biofilm-Forming Bacteria. *Antibiotics* 2025, 14, 808, doi:10.3390/antibiotics14080808.X
4. La Corte, C.; Catania, V.; Dara, M.; Parrinello, D.; Staropoli, M.; Trapani, M.R.; Cammarata, M.; Parisi, M.G. Equinins as Novel Broad-Spectrum Antimicrobial Peptides Isolated from the Cnidarian Actinia Equina (Linnaeus, 1758). *Marine Drugs* 2024, 22, 172, doi:10.3390/md22040172.
5. Logashina, Y.A.; Solstad, R.G.; Mineev, K.S.; Korolkova, Y.V.; Mosharova, I.V.; Dyachenko, I.A.; Palikov, V.A.; Palikova, Y.A.; Murashev, A.N.; Arseniev, A.S.; et al. New Disulfide-Stabilized Fold Provides Sea Anemone Peptide to Exhibit Both Antimicrobial and TRPA1 Potentiating Properties. *Toxins* 2017, 9, 154, doi:10.3390/toxins9050154.
6. Guo, Q.; Fu, J.; Yuan, L.; Liao, Y.; Li, M.; Li, X.; Yi, B.; Zhang, J.; Gao, B. Diversity Analysis of Sea Anemone Peptide Toxins in Different Tissues of *Heteractis Crispa* Based on Transcriptomics. *Sci Rep* 2024, 14, 7684, doi:10.1038/s41598-024-58402-2.

7. Kvetkina, A.; Kostina, E.; Gladkikh, I.; Chausova, V.; Yurchenko, E.; Bakunina, I.; Pivkin, M.; Anastyuk, S.; Popov, R.; Monastyrnaya, M.; et al. Deep-Sea Anemones Are Prospective Source of New Antimicrobial and Cytotoxic Compounds. *Marine Drugs* 2021, 19, 654, doi:10.3390/md19120654.
8. Da Silva, D.L.; Valladão, R.; Beraldo-Neto, E.; Coelho, G.R.; Neto, O.B.D.S.; Vigerelli, H.; Lopes, A.R.; Hamilton, B.R.; Undheim, E.A.B.; Sciani, J.M.; et al. Spatial Distribution and Biochemical Characterization of Serine Peptidase Inhibitors in the Venom of the Brazilian Sea Anemone *Anthopleura Cascaia* Using Mass Spectrometry Imaging. *Marine Drugs* 2023, 21, 481, doi:10.3390/md21090481.
9. Aron, A. T.; Gentry, E. C.; Mcphail, K. L.; Nothias, L.; Nothias-Esposito, M.; Bouslimani, A.; Petras, D.; Gauglitz, J. M.; Sikora, N.; Vargas, F. Reproducible molecular networking of untargeted mass spectrometry data using GNPS. *Nature Protocols*, [S.L.], v. 15, n. 6, p. 1954-1991, 13 maio 2020. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/s41596-020-0317-5>.
10. Banik, B.K.; Banerjee, B.; Kaur, G.; Saroch, S.; Kumar, R. Tetrabutylammonium Bromide (TBAB) Catalyzed Synthesis of Bioactive Heterocycles. *Molecules* 2020, 25, 5918, doi:10.3390/molecules25245918.
11. Ingalsbe, M.L.; Denis, J.D.St.; McGahan, M.E.; Steiner, W.W.; Priefer, R. Development of a Novel Expression, ZIMAX/KZI, for Determination of the Counter-Anion Effect on the Antimicrobial Activity of Tetrabutylammonium Salts. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 2009, 19, 4984–4987, doi:10.1016/j.bmcl.2009.07.066 Arnold, W.A.; Blum, A.; Branyan, J.; Bruton, T.A.; Carignan, C.C.; Cortopassi, G.; Datta, S.; DeWitt, J.; Doherty, A.-C.; Halden, R.U.; et al. Quaternary Ammonium Compounds: A Chemical Class of Emerging Concern. *Environ. Sci. Technol.* 2023, 57, 7645–7665, doi:10.1021/acs.est.2c08244.
12. DeLeo, P.C.; Huynh, C.; Pattanayek, M.; Schmid, K.C.; Pechacek, N. Assessment of Ecological Hazards and Environmental Fate of Disinfectant Quaternary Ammonium Compounds. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 2020, 206, 111116, doi:10.1016/j.ecoenv.2020.111116.
13. Inayat, S.; Ahmad, S.R.; Awan, S.J.; Nawshad, M.; Ali, Q. In Vivo and in Vitro Toxicity Profile of Tetrabutylammonium Bromide and Alcohol-Based Deep Eutectic Solvents. *Sci Rep* 2023, 13, 1777, doi:10.1038/s41598-023-28928-y.



#### 4. CONCLUSÃO

Em conclusão, este estudo isolou e identificou com sucesso o tetrabutylamônio da anêmona-do-mar *Anthopleura cascaia* como um composto com atividade antimicrobiana promissora contra *Klebsiella pneumoniae* multirresistente. Embora os resultados da microdiluição tenham mostrado inibição moderada, a atividade biocida em concentrações mais elevadas destaca o seu potencial como agente bactericida. Os organismos marinhos apresentam-se como importantes fontes de novas moléculas bioativas, em especial antimicrobianos, campo que requer novas terapias para enfrentar a crise global de saúde da resistência aos antibióticos.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABRANTES, Jaime Antonio; NOGUEIRA, Joseli Maria Da Rocha. Resistência bacteriana aos antimicrobianos: uma revisão das principais espécies envolvidas em processos infecciosos. *Revista Brasileira de Análises Clínicas*, v. 53, n. 3, 2022.
- AYDOS, Luiza Fichtner. *Micro-organismos marinhos como fonte de metabólitos bioativos: atividade contra biofilmes patogênicos*. 2016. 79 f. Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2016.
- BADIN, Flávio. *Biocidas Naturais e Seus Reflexos Sobre Contaminantes Na Produção De Etanol*. [S.d.].
- BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE. ANVISA. *Manual em Microbiologia Clínica para o Controle de Infecção em Serviços de Saúde*. Brasília: ANVISA, 2004.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde e Ambiente. *Boletim Epidemiológico: Microrganismos resistentes aos carbapenêmicos e sua distribuição no Brasil, 2015 a 2022*. Brasília, DF, n. 2, v. 55, 17 jan. 2024.
- CARVALHO, Júlia Cândido et al. Pesquisa de *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae* em estetoscópios e aparelhos celulares de profissionais da saúde em um hospital privado de Anápolis – Goiás e seu perfil de sensibilidade aos antimicrobianos. *Research, Society and Development*, v. 12, n. 4, p. e25712440388, 18 abr. 2023.
- COSTA, Kátia Gonçalves. *Transmissão de acinetobacter baumannii resistente em uma unidade de terapia intensiva: abordagem do ambiente e da higiene das mãos através de um modelo matemático determinístico*. p. viii,68-viii,68, 2010.
- DE OLIVEIRA SOUZA, Cintya et al. *Escherichia coli enteropatogênica: uma categoria diarreio gênica versátil*. *Revista Pan-Amazônica de Saúde*, v. 2, n. 7, p. 1–2, jul. 2016.
- DE SOUSA, Cristina Paiva. *SEGURANÇA ALIMENTAR E DOENÇAS VEICULADAS POR ALIMENTOS: UTILIZAÇÃO DO GRUPO COLIFORME COMO UM DOS INDICADORES DE QUALIDADE DE ALIMENTOS*. 2006.
- ELSHOBARY, Mostafa E.; BADAWY, Nadia K.; ASHRAF, Yara; ZATIOUN, Asmaa A.; MASRIYA, Hagar H.; AMMAR, Mohamed M.; MOHAMED, Nourhan A.; MOURAD, Sohaila; ASSY, Abdelrahman M.. *Combating Antibiotic Resistance: mechanisms, multidrug-resistant pathogens, and novel therapeutic approaches*. *Pharmaceuticals*, [S.L.], v. 18, n. 3, p. 402, 12 mar. 2025. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/ph18030402>.
- FELÍCIO, Rafael De; OLIVEIRA, Ana Ligia Leandrini De; DEBONSI, Hosana Maria. *Bioprospecção a partir dos oceanos: conectando a descoberta de novos fármacos aos produtos naturais marinhos*. *Ciência e Cultura*, v. 64, n. 3, p. 39–42, 2012.
- GUO, Qiqi; FU, Jinxing; YUAN, Lin; LIAO, Yanling; LI, Ming; LI, Xinzhong; YI, Bo; ZHANG, Junqing; GAO, Bingmiao. *Diversity analysis of sea anemone peptide toxins in different tissues of *Heteractis crispa* based on transcriptomics*. *Scientific Reports*, [S.L.], v. 14, 1 abr. 2024. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-024-58402-2>.

HAN, Huihui et al. Improved Stability and Activity of a Marine Peptide-N6NH<sub>2</sub> against *Edwardsiella tarda* and Its Preliminary Application in Fish. *Marine Drugs*, v. 18, n. 12, p. 650, 17 dez. 2020.

HOWARD, Aoife et al. *Acinetobacter baumannii*: An emerging opportunistic pathogen. *Virulence*, v. 3, n. 3, p. 243–250, maio 2012.

HU, Ya; FENG, Yu; ZONG, Zhiyong. Global distribution of *Klebsiella pneumoniae* producing extended-spectrum  $\beta$ -lactamases in neonates. *Precision Clinical Medicine*, [S.L.], v. 7, n. 4, 11 out. 2024. Oxford University Press (OUP).

JOUIAEI, Mahdokht et al. Ancient Venom Systems: A Review on Cnidaria Toxins. *Toxins*, v. 7, n. 6, p. 2251–2271, 18 jun. 2015.

KVETKINA, Aleksandra et al. Deep-Sea Anemones Are Prospective Source of New Antimicrobial and Cytotoxic Compounds. *Marine Drugs*, v. 19, n. 12, p. 654, 24 nov. 2021.

LA CORTE, Claudia et al. Equinins as Novel Broad-Spectrum Antimicrobial Peptides Isolated from the Cnidarian *Actinia equina* (Linnaeus, 1758). *Marine Drugs*, v. 22, n. 4, p. 172, 12 abr. 2024.

LIMA, William Gustavo De. Multirresistentes: Eficácia in vitro e in vivo, toxicidade e formulação farmacêutica. [S.d.].

MACHADO, Elisabete; SOUSA, João Carlos. New Antibiotics for Treating Infections Caused by Multidrug-Resistant Bacteria. *Antibiotics*, [S.L.], v. 14, n. 10, p. 997, 5 out. 2025. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/antibiotics14100997>.

MARIOTTINI, Gian; PANE, Luigi. Cytotoxic and Cytolytic Cnidarian Venoms. A Review on Health Implications and Possible Therapeutic Applications. *Toxins*, v. 6, n. 1, p. 108–151, 27 dez. 2013.

MENEZES, Cecelia; THAKUR, Narsinh L. Sea anemone venom: Ecological interactions and bioactive potential. *Toxicon*, v. 208, p. 31–46, mar. 2022.

MUELLER, Matthew; TAINTER, Christopher R. *Escherichia coli* Infection. In: StatPearls [Internet]. [S.l.]: StatPearls Publishing, 2023.

NAGHAVI, M. et al. Global burden of bacterial antimicrobial resistance 1990–2021: A systematic analysis with forecasts to 2050. *The Lancet*, London, v. 404, n. 10457, p. 977–994, 28 set. 2024.

NAVON-VENEZIA, Shiri; KONDRATYEVA, Kira; CARATTOLI, Alessandra. *Klebsiella pneumoniae*: a major worldwide source and shuttle for antibiotic resistance. *Fems Microbiology Reviews*, [S.L.], v. 41, n. 3, p. 252–275, 1 maio 2017. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/femsre/fux013>.

PAULO, Pedro Felipe de Moraes. Utilização da HPLC (High Pressure Liquid Chromatography) para identificação do elemento antibacteriano extraído via hexano de *Aristolochia gigantea*. 2012. 47 f. Trabalho de conclusão de curso (licenciatura e bacharelado - Ciências Biológicas) - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Instituto de Biociências de Rio Claro, 2012.

PEDROSO, Bianca Silva. Infecção de Corrente Sanguínea por *Klebsiella Pneumoniae* Resistente a Carbapenêmico no Hospital do Servidor Público Estadual. *The Brazilian Journal of Infectious Diseases*, v. 25, p. 101364, jan. 2021.

QUEIROZ, Yamine Maia De; MACIEL, Isaura Abreu; SANTOS, Fabiolla Da Silva Dos. Mecanismo de resistência da bactéria *Acinetobacter Baumannii* e suas implicações no controle das infecções hospitalares. *Revista Brasileira de Análises Clínicas*, v. 54, n. 1, p. 37–43, 2022.

RIU, Marta; CHIARELLO, Pietro; TERRADAS, Roser; SALA, Maria; GARCIA-ALZORRIZ, Enric; CASTELLS, Xavier; GRAU, Santiago; COTS, Francesc. Cost Attributable to Nosocomial Bacteremia. Analysis According to Microorganism and Antimicrobial Sensitivity in a University Hospital in Barcelona. *Plos One*, [S.L.], v. 11, n. 4, 7 abr. 2016. Public Library of Science (PLOS). <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0153076>.

SANTANA, Tatiana Cristina Fonseca Soares De et al. Perfil de Resistência de *Escherichia Coli* e *Klebsiella spp* Isoladas de Urocultura de Comunidade do Município de São Luis-Ma no Período de 2005-2008. *Revista de Patologia Tropical*, v. 41, n. 3, 22 out. 2012.

SATI, Hatim; CARRARA, Elena; SAVOLDI, Alessia; HANSEN, Paul; GARLASCO, Jacopo; CAMPAGNARO, Enrica; BOCCIA, Simone; CASTILLO-POLO, Juan Antonio; MAGRINI, Eugenia; GARCIA-VELLO, Pilar. The WHO Bacterial Priority Pathogens List 2024: a prioritisation study to guide research, development, and public health strategies against antimicrobial resistance. *The Lancet Infectious Diseases*, [S.L.], v. 25, n. 9, p. 1033-1043, set. 2025. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s1473-3099\(25\)00118-5](http://dx.doi.org/10.1016/s1473-3099(25)00118-5).

SILVA, Daiane Laise da; VALLADÃO, Rodrigo; BERALDO-NETO, Emidio; COELHO, Guilherme Rabelo; SILVA NETO, Oscar Bento da; VIGERELLI, Hugo; LOPES, Adriana Rios; HAMILTON, Brett R.; UNDHEIM, Eivind A. B.; SCIANI, Juliana Mozer. Spatial Distribution and Biochemical Characterization of Serine Peptidase Inhibitors in the Venom of the Brazilian Sea Anemone *Anthopleura cascaia* Using Mass Spectrometry Imaging. *Marine Drugs*, [S.L.], v. 21, n. 9, p. 481, 30 ago. 2023. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/md21090481>.