

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE FARMÁCIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBIOFILME DE METABÓLITOS PRODUZIDOS  
POR BACTÉRIAS ANTÁRTICAS E ASSOCIADAS À PLANTAS CARNÍVORAS  
SOBRE *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa***

FERNANDA CAROLINA VEIGA

Porto Alegre, 2023



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE FARMÁCIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBIOFILME DE METABÓLITOS PRODUZIDOS  
POR BACTÉRIAS ANTÁRTICAS E ASSOCIADAS À PLANTAS CARNÍVORAS  
SOBRE *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa***

Dissertação apresentada por Fernanda Carolina Veiga para obtenção do Grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas, ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Orientador: Prof. Dr. Alexandre José Macedo

Porto Alegre, 2023

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, em nível de Mestrado Acadêmico da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e aprovada em 29/06/2023, pela Banca Examinadora constituída por:

Profa. Dr. Adriana Seixas

Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre

Profa. Dr. Ana Paula Frazzon

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Profa. Dr. Karine Rigon Zimmer

Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre

VEIGA, FERNANDA CAROLINA

Avaliação da atividade antibiofilme de metabólitos produzidos por bactérias antárticas e associadas à plantas carnívoras sobre *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa* / FERNANDA CAROLINA VEIGA. -- 2023.

126 f.

Orientador: Alexandre José Macedo.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Farmácia, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Porto Alegre, BR-RS, 2023.

1. Antártica. 2. Biofilme. 3. Drosera. 4. *P. aeruginosa*. 5. *S. aureus*. I. Macedo, Alexandre José, orient. II. Título.

## **AGRADECIMENTOS**

Antes de tudo e de todos, gratidão a Deus por me permitir chegar aonde estou; por me capacitar durante o processo; por me sustentar frente aos obstáculos e aos imprevistos; por me conduzir em meio às incertezas. Somente Ele e eu sabemos como foi esse trajeto até aqui.

Aos meus familiares, em especial, a minha mãe (Edna) por todo seu amor e por toda a minha vida; e ao meu irmão (Luís Guilherme), que acreditaram em mim até mesmo quando nem eu acreditei. Essa conquista também é para vocês e por vocês!

Ao Márcio, meu namorado, amigo, motivador e muitas vezes facilitador do processo, pelo apoio em tudo na vida. Eu por você e você por nós.

Ao meu orientador, Alexandre Macedo, pela oportunidade única em fazer parte da sua equipe, por toda a atenção, pelo conhecimento e, principalmente, pela paciência.

A todos os colegas do LaBDiM, Flávia, Dayse, Rodrigo, Deisiane e agregados, muito obrigada pela troca de saberes. Conhecer vocês foi muito enriquecedor e fizeram toda a diferença para concluir essa etapa.

Por fim, ao meu fofo e amável cãozinho, Churro, obrigada por ser minha companhia diária ao longo desses anos. Meus dias não seriam tão felizes sem a sua presença.



## RESUMO

*Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus* são bactérias patogênicas envolvidas em infecções humanas graves, com capacidade de formar biofilmes. A ausência de drogas com capacidade para inibir a formação desses biofilmes representa um problema de saúde global. Microrganismos de diferentes ambientes são conhecidos pela produção de compostos biologicamente ativos com capacidade de tratar infecções relacionadas ao biofilme. Nesse contexto, esse estudo teve como objetivo a busca de metabólitos secundários de bactérias do ambiente antártico e de epífitas de plantas carnívoras do gênero *Drosera*, que possuam atividade contra a formação de biofilme de *P. aeruginosa* ATCC 27853 e *S. aureus* ATCC 6538. O rastreamento de atividade antibiofilme foi realizado de uma bacterioteca contendo 76 isolados do ambiente antártico e 104 microrganismos epífitos provenientes do gênero *Drosera*. Entre as 180 cepas isoladas, sete do ambiente antártico e cinco associadas à plantas carnívoras foram cultivadas. Os sobrenadantes resultantes foram extraídos por extração líquido/líquido e as amostras mais ativas foram fracionadas por extração de fase sólida. A cepa antártica N52R1 foi identificada como *Bacillus siamensis* e mostrou atividade contra formação de biofilme de *P. aeruginosa* e *S. aureus*. Sugere-se que as moléculas surfactina e pumilacidina B, presentes nas frações, sejam as possíveis responsáveis pela bioatividade. Sobre os 5 sobrenadantes obtidos de bactérias epífitas, BCP-514 (*Bacillus subtilis*) e BCP-320 (*Bacillus mobilis*) se destacaram para atividade de antiformação de biofilme contra *S. aureus*. A análise do genoma de *B. mobilis* revelou a presença de moléculas envolvidas na síntese de compostos antimicrobianos, como fengicina, bacillibactina, petrobactina, martiapeptídeo A e paeninodina. Os testes de toxicidade em larvas de *Galleria mellonella* foram bem sucedidos para as frações mais ativas, nas concentrações de 100 e 200 mg/kg. Em conclusão, este trabalho evidencia que os metabólitos secundários, das cepas identificadas, apresentaram capacidade antibiofilme contra a formação de biofilme de *P. aeruginosa* e *S. aureus*. Esses dados contribuem para o aumento das possibilidades de desenvolvimento de novos agentes terapêuticos.

**Palavras-chave:** Antártica; Biofilme; *Drosera*; *P. aeruginosa*; *S. aureus*





## ABSTRACT

*Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* are pathogenic bacteria involved in serious human infections, with the ability to form biofilms. The absence of drugs capable of inhibiting the formation of these biofilms represents a global health problem. Microorganisms from different environments are known to produce biologically active compounds capable of treating biofilm-related infections. In this context, this study aimed to search for secondary metabolites of bacteria from the Antarctic environment and epiphytes of carnivorous plants of the genus *Drosera*, which have activity against biofilm formation of *P. aeruginosa* ATCC 27853 and *S. aureus* ATCC 6538. Antibiofilm formation activity tracking was carried out in a bacteriotheque containing 76 isolates from the Antarctic environment and 104 epiphytic microorganisms from the genus *Drosera*. Among the 180 strains isolated, seven from the Antarctic environment and five associated with carnivorous plants were cultivated. The resulting supernatants were extracted by liquid/liquid extraction and the most active samples were fractionated by solid phase extraction. The Antarctic strain N52R1 was identified as *Bacillus siamensis* and showed activity against biofilm formation of *P. aeruginosa* and *S. aureus*. It is suggested that surfactin and pumilacidin B molecules, present in the fractions, are possibly responsible for the bioactivity. Of the 5 supernatants obtained from epiphytic bacteria, BCP-514 (*Bacillus subtilis*) and BCP-320 (*Bacillus mobilis*) stood out for antibiofilm formation activity against *S. aureus*. Analysis of the genome of *B. mobilis* revealed the presence of molecules involved in the synthesis of antimicrobial compounds, such as fengycin, bacillibactin, petrobactin, martiapeptide A and paeninodine. Toxicity tests on *Galleria mellonella* larvae were successful for the most active fractions, at concentrations of 100 and 200 mg/kg. In conclusion, this work shows that the secondary metabolites of the identified strains showed bioactivity capacity against the formation of biofilms of *P. aeruginosa* and *S. aureus*. These data contribute to increase the possibilities of developing new therapeutic agents.

**Keyword:** Antarctica; Biofilm; *Drosera*; *P. aeruginosa*; *S. aureus*



## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b>	<b>13</b>
<b>2. OBJETIVOS</b>	<b>19</b>
2.1 Objetivo geral	21
2.2 Objetivos específicos	21
<b>3. REFERENCIAL TEÓRICO</b>	<b>23</b>
3.1 Biofilme e sua problemática	25
3.2 Diversidade microbiana e produção de metabólitos bioativos	29
3.3 Bioatividade de metabólitos secundários bacterianos	32
3.4 Metabólitos bacterianos com atividade antibiótica e antibiofilme	33
3.4.1 Metabólitos secundários sintetizados por Firmicutes	34
3.4.2 Metabólitos secundários sintetizados por Actinomicetos	37
3.4.3 Metabólitos secundários sintetizados por Proteobactérias	41
3.4.4 Metabólitos secundários sintetizados por outros filos	43
<b>CAPÍTULO I</b>	<b>43</b>
<b>1. INTRODUCTION</b>	<b>48</b>
<b>2. MATERIALS AND METHODS</b>	<b>49</b>
2.1 Collection of samples and cultivation conditions	49
2.2 Antibiofilm formation and bacterial growth inhibition assay	50
2.3 Bacterial identification	51
2.4 Chemical and structural characterization of metabolites	51
2.5 In vivo toxicity test on <i>Galleria mellonella</i> larvae	52
2.6 Statistical analysis	53
<b>3. RESULTS AND DISCUSSION</b>	<b>53</b>
3.1 Screening of antibiofilm formation and antimicrobial activity	53
3.2 Identification of the isolate N52R1	55
3.3 Fractionation of hexane and aqueous extracts - Solid Phase Extraction (SPE)	57
3.4 Chemical and structural identification of compounds	63
3.5 In vivo toxicity in larvae of <i>Galleria mellonella</i>	67
<b>4. CONCLUSIONS</b>	<b>70</b>
<b>REFERENCES</b>	<b>70</b>
<b>CAPÍTULO II</b>	<b>77</b>
<b>1. INTRODUCTION</b>	<b>79</b>
<b>2. MATERIALS AND METHODS</b>	<b>81</b>
2.1 Collection of samples and cultivation conditions	81
2.2 Obtaining extracts containing metabolites	81
2.3 Antibiofilm formation and bacterial growth inhibition assay	82
2.4 Bacterial identification	83
2.5 Genome sequencing and analysis of <i>Bacillus mobilis</i>	83

2.6 In vivo toxicity test on <i>Galleria mellonella</i> larvae	83
2.7 Statistical analysis	84
<b>3. RESULTS AND DISCUSSION</b>	
<b>3.1 Screening of antibiofilm formation and antimicrobial activity</b>	<b>84</b>
3.2 Identification of isolates BCP-320 and BCP-514	86
3.3 Fractionation of BCP-514 hexane and BCP-320 ethyl acetate extracts	87
3.4 Phylogenetic analysis of BCP-320	89
3.5 Features of the genome of BCP-320	92
3.6 In vivo toxicity in a larval model of <i>Galleria mellonella</i>	96
<b>4. CONCLUSIONS</b>	<b>99</b>
<b>REFERENCES</b>	<b>99</b>
<b>4. DISCUSSÃO GERAL</b>	<b>105</b>
<b>5. CONCLUSÃO GERAL</b>	<b>111</b>
<b>6. REFERÊNCIAS</b>	<b>115</b>

## 1. INTRODUÇÃO



A ineficácia dos agentes antimicrobianos frente a microrganismos resistentes é um desafio global presentemente discutido por um plano de ação mundial, endossado pela Organização Mundial da Saúde (WHO, 2015). Infecções resistentes aos antibióticos existentes são um perigo alarmante, na saúde pública, em todo o planeta. A escassez de novos fármacos nessa categoria e o uso incorreto de terapêuticas mais antigas, denotam que as cepas multirresistentes estão aumentando (WHO, 2016). Além disso, essa problemática é agravada pelo desenvolvimento do biofilme. Os microrganismos existentes nas matrizes do biofilme evidenciam tolerância aos antibióticos em até 1.000 vezes maior, quando comparados aos planctônicos (PENESYAN; GILLINGS; PAULSEN, 2015).

Biofilmes são comunidades de células microbianas que estão ligadas umas às outras e/ou a uma superfície, e estão embebidas em uma matriz extracelular produzida pela bactéria e/ou derivada do hospedeiro. Essa matriz tem sua própria arquitetura interna e circulação de nutrientes, a qual geralmente se liga a uma superfície, seja ela biótica ou abiótica - dispositivos médicos como cateteres, dentes, entre outros (MACIA et al., 2014; SAEED et al., 2019; COENYE et al., 2018). Uma característica ímpar da persistência do biofilme é que as comunidades presentes podem abrigar células tolerantes e persistentes, que apresentam capacidade de sobreviver a terapia antibiótica e as defesas imunológicas do hospedeiro e tornam a crescer quando o tratamento é encerrado (BRAUNER et al., 2016).

Uma outra propriedade constituinte do biofilme é o fato de que a maioria dos antibióticos não conseguem acessar profundamente as células microbianas, devido a existência da matriz. Supõe-se que o aumento da tolerância a antibióticos e a persistência em biofilmes possivelmente resultam da modificação fisiológica das células do biofilme. Essas células, por sua vez, inseridas no interior de biofilmes espessos podem se encontrar em fase estacionária, devido a penetração de nutrientes e oxigênio ser limitada, pelo fato da demanda de consumo utilizada por células periféricas (YAN et al., 2018).

Estudos recentes apontam a formação de biofilmes polimicrobianos ou multibacterianos (associação de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas). Nesses biofilmes, polimicrobianos, podem co-existir microrganismos multiespécies, como a presença de duas bactérias diferentes, por exemplo, *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus* (BEAUDOIN et al., 2017; LOPES et al., 2018).

*Pseudomonas aeruginosa* é um patógeno oportunista que ocasiona infecções crônicas por meio da formação de biofilme em pacientes com sistema imunológico debilitado, queimaduras, dispositivos internos e fibrose cística (FC). Pacientes diabéticos são suscetíveis ao desenvolvimento de feridas crônicas, caracterizadas pela ausência de cicatrização, podendo até causar amputação, que em sua maioria provém da infecção por biofilmes bacterianos compostos por *P. aeruginosa* e *S. aureus* (BHATTACHARYA et al., 2018; KOVACH et al., 2017).

Além disso, é importante ressaltar que o tratamento de pacientes infectados, com estas bactérias, é dispendioso, acarreta maior tempo de hospitalização, uso de medicamentos de alto custo, conduzindo à morbimortalidade. Estes patógenos estão entre os mais comumente relacionados à resistência bacteriana, sendo a causa de infecções nosocomiais (KOVACH et al., 2017; THEURETZBACHER, 2013).

Nesse contexto, a busca por moléculas bioativas inéditas e eficientes se tornou um alvo de interesse para a atualização da farmacoterapia de doenças infecciosas. Diversas moléculas isoladas para estes tipos de tratamentos são oriundas de microrganismos, dos mais variados ambientes. A necessidade de adaptação e sobrevivência estimula a produção de metabólitos com funções ecológicas distintas, como métodos de defesa contra inimigos naturais, predadores e competidores. Entre estas moléculas é possível identificar compostos para o controle de biofilmes patogênicos por diferentes estratégias, seja impedindo a formação do biofilme, pela modulação ou erradicação de biofilmes formados (MACEDO, ABRAHAM, 2009; TRENTIN et al., 2013).

Dessa forma, o objetivo deste estudo compreende a busca por moléculas com atividade antibiofilme, sobre os patógenos *S. aureus* e *P. aeruginosa*, com o intuito de isolar e identificar estas biomoléculas provenientes do metabolismo secundário de bactérias associadas à plantas carnívoras (gênero *Drosera*) e de um ambiente extremo, como a Antártida.

A interação simbiótica, entre planta e bactéria, é relevante para a sobrevivência da espécie vegetal. Os benefícios da associação garantem proteção contra patógenos, estimula o crescimento, contribui para a mineralização de nutrientes, fixação de nitrogênio e no auxílio da decomposição e digestão de insetos (LIMA et al., 2018). Nessa perspectiva, os microrganismos originários da Antártica devido à complexidade do habitat desenvolvem estratégias de sobrevivência como interações antagonistas interespecíficas, que podem levar a produção de compostos



com atividade contra outros patógenos. Com esse propósito, esses microrganismos têm mostrado relevante potencial como uma ferramenta promissora para a descoberta de substâncias com diferentes aplicações biotecnológicas e farmacoterapêuticas (DANILOVICH et al., 2018; GIUDICE; FANI, 2016).



## **2. OBJETIVOS**



## 2.1 Objetivo geral

Realizar a busca de compostos ativos contra biofilmes de bactérias das espécies *S. aureus* e *P. aeruginosa*, a partir de microrganismos isolados do pólo Antártico e associados a plantas carnívoras.

## 2.2 Objetivos específicos

- Rastrear a atividade antibiofilme e antimicrobiana dos sobrenadantes oriundos de bactérias do ambiente Antártico sobre os patógenos *S. aureus* (American Type Culture Collection ATCC 6538) e *P. aeruginosa* (ATCC 27853);
- Avaliar a atividade antibiofilme e antimicrobiana dos sobrenadantes obtidos pelo cultivo de bactérias associadas à plantas carnívoras, do gênero *Drosera*, sobre os patógenos *S. aureus* (ATCC 6538) e *P. aeruginosa* (ATCC 27853);
- Identificar as cepas produtoras dos extratos mais ativos, por sequenciamento do gene *16S rRNA*;
- Fracionar os extratos brutos com atividade biológica e caracterizar os compostos bioativos quanto à natureza química e estrutural;
- Avaliar a toxicidade *in vivo* das frações mais promissoras, em larvas de *Galleria mellonella*.



### **3. REFERENCIAL TEÓRICO**





### 3.1 Biofilme e sua problemática

Os microrganismos apresentam forma de vida livre ou em conjunto de espécies diferentes ou iguais, denominado biofilme. Nesses agregados existem alterações em termos de taxa de crescimento e expressão gênica, quando comparados às suas formas planctônicas. O biofilme é uma capa protetora em torno de si mesmos. Surgiu como estratégia de sobrevivência para o desenvolvimento de uma interação com o hospedeiro, para resistir a condições externas hostis - estresses ambientais, ausência de nutrientes, antimicrobianos, entre outros (CASTIBLANCO; SUNDIN, 2016; GUPTA et al, 2016; LOHSE et al, 2018).

A tolerância antibiótica das bactérias no interior do biofilme contribui para as infecções crônicas, visto que estes mecanismos não são semelhantes aos planctônicos. Nas comunidades de biofilme a tolerância aos antibióticos surge devido a várias estratégias como introdução lenta ou incompleta dos antibióticos, microambiente químico modificado. Somado a isso, pode existir um subgrupo de microrganismos em um biofilme (uma forma de diferenciação celular análoga à formação de esporos). Essas artimanhas são resultados da natureza multicelular dos biofilmes que promove a tolerância aos antibióticos (SUGIMOTO et al, 2016).

Além de bloquearem o acesso de antibióticos e células imunes do hospedeiro nas comunidades de biofilme bacteriano, os biofilmes garantem proteção aos microrganismos contra alteração de pH, osmolaridade, escassez de nutrientes, forças mecânicas e de cisalhamento. Dessa forma, a matriz de biofilme fornece tolerância adicional às bactérias, o que as tornam multirresistentes, fortemente resistentes e completamente resistentes a medicamentos (SHARMA et al, 2019).

Após a instalação do biofilme, as bactérias aderidas continuam se multiplicando e mantém conexões intercelulares, formando microcolônias compreendidas em uma matriz extracelular. Um biofilme maduro é uma estrutura de três camadas: camada reguladora interna, camada basal microbiana intermediária e camada externa habitada pela forma planctônica de microrganismos que estão prontos para sair do biofilme (COSTERTON et al., 1995; FLEMMING; WINGENDER, 2010).

Segundo Visnapuu et al (2022) o arranjo da matriz com o contato entre as espécies bacterianas residentes origina um fenótipo específico do biofilme que é diferente das bactérias planctônicas de flutuação livre. Enquanto em alguns estudos se afirma que o biofilme é o modo de crescimento padrão, em outros se admite que estímulos específicos. Nesse sentido, esses estímulos teriam funções como defesa contra distintos estressores, colonização de superfícies favoráveis ou aproveitamento das vantagens do comportamento comunitário induzindo a mudança para esse modo de vida.

Essas associações microbianas imóveis que se instalam em superfícies de implantes médicos, como suturas, cateteres e implantes dentários, auto produzem por meio de sinalização intercelular e intracelular um tipo de substância polimérica extracelular (EPS). Essa EPS resulta em infecções, as quais são possíveis de intervenção por meio de sua remoção e conduzem a tratamentos inacessíveis. A matriz EPS sustenta as células bacterianas unidas e favorecem o desenvolvimento de agregados multicelulares, que tornam o ambiente heterogêneo no interior do biofilme e o capacitam para funcionar como um sistema multicelular (COSTERTON et al., 1999; NÚNEZ et al, 2013).

A matriz EPS é composta de polissacarídeos, proteínas, lipídios e DNA extracelular (eDNA). Essa matriz medeia as interações intercelulares e a transferência horizontal de genes; aprimora a captação de recursos e a fixação à superfície; e fornece capacidade digestiva, proteção sobre fatores externos e inibição da desidratação bacteriana (COSTERTON et al., 2005).

Estudos apontaram que a função da EPS tem conferido tolerância aos antimicrobianos do grupo aminoglicosídeo. Essa substância extrapolimérica possui capacidade de inibir a atividade de antibióticos, que se dispersam por meio dos biofilmes pelo bloqueio da reação de difusão. Além disso, pode quelar os antibióticos por formação de complexos ou degradar por meio de reações enzimáticas (BILLINGS et al., 2015).

No biofilme maduro, a EPS irá compor mais de 90% da massa seca do biofilme. A matriz extracelular além de formar um escudo protetor em volta das bactérias, também age como um reservatório de compostos metabólicos e nutrientes (TOYOFUKU et al., 2016). Posteriormente, o biofilme maduro se rompe ativamente (motilidade e dispersão conforme a degradação da EPS) ou passivamente (fatores

físicos como dispersão em função do fluxo de líquido) deslocando, assim, as células para iniciar um novo ciclo de formação do biofilme (COSTERTON et al., 1999).

O biofilme é considerado o fator chave na persistência e desenvolvimento de infecções bacterianas. É composto por associações de comunidades bacterianas envoltas em uma matriz exopolimérica, a qual se liga às superfícies bióticas e abióticas. Embora a formação do biofilme varie entre as espécies bacterianas, diversos estudos genéticos concordam com um modelo básico amplamente reconhecido. Esse modelo se inicia pela sinalização de um sistema entre as células dos microrganismos, denominado *quórum sensing*, desencadeando três etapas: adesão inicial/fixação à superfície, crescimento de microcolônias/maturação e, posteriormente, desprendimento/dispersão celular (CAMPOCCIA et al., 2019; GARRETT et al., 2008).

Em experimentos, a formação de biofilme, por determinadas cepas de bactérias flageladas, em forma de bastonete, envolve várias etapas em um ambiente aquoso e fluido. Células recém-fixadas estão levemente associadas a uma superfície, com forte capacidade de se desprender. Durante a formação, algumas células planctônicas entram na fase de ligação irreversível, cujas células permanecem planas sobre a superfície e resistem às tentativas de desprendê-las fisicamente. Após adesão irreversível, as células se proliferam e iniciam a síntese dos componentes da matriz do biofilme, originando pequenos aglomerados de bactérias denominados microcolônias (ARMBRUSTER; PARSEK, 2018).

Em biofilmes de *P. aeruginosa*, os flagelos possibilitam que as células tenham contato reversível com uma área, que é, posteriormente, examinada por mecanismos de motilidade de superfície. Em sequência, a adesão irreversível à região é obtida, principalmente, pelo exopolissacarídeo Psl. Além disso, as fímbrias associadas à superfície também foram apontadas como envolvidas na fixação do biofilme (HA; O'TOOLE, 2015). Em diversas espécies Gram-negativas, inclusive em *P. aeruginosa*, foi descoberta uma molécula chave de sinalização intracelular associada neste processo, denominada di-GMP cíclico (c-di-GMP). No estágio de biofilme as células apresentam alta quantidade de c-di-GMP, que favorece a produção de matriz de biofilme e bloqueia a motilidade de natação coordenada por flagelos (ARMBRUSTER; PARSEK, 2018).

Nos biofilmes de *S. aureus* a fixação ocorre por distintos fatores, dependendo do tipo de substrato e o crescimento do biofilme demonstrou evoluir por meio de um

processo de desenvolvimento de cinco estágios, incluindo: fixação, multiplicação, êxodo, maturação e dispersão. As células se ligam a superfícies por meio de interações hidrofóbicas ou componentes de superfície microbiana que reconhecem moléculas de matriz adesiva, respectivamente. Em seguida o biofilme se desenvolve em um plano concentrado de células composto de um eDNA e matriz proteica. Posteriormente, ocorre o estágio de êxodo em que uma subpopulação de células é liberada do biofilme via degradação de eDNA. As microcolônias se formam a partir de pontos distintos de células que permaneceram aderidas durante a etapa de êxodo. A detecção de *quórum* mediada por *Agr* (regulador do gene acessório) inicia a modulação da matriz de biofilme e a dispersão de células via ativação de protease e/ou produção de PSM (modulinas solúveis em fenol) (MOORMEIER et al., 2014).

O período estacionário, caracterizado por uma fase lenta ou sem crescimento do ciclo de vida bacteriano e o estado viável, mas não cultivável (estado de dormência) são as maneiras de sobrevivência para comunidades de biofilmes bacterianos sob estresse antibióticos. Essa etapa promove suscetibilidade reduzida aos antimicrobianos. Diversas organizações de biofilmes entram na fase estacionária conforme o tempo indicando que biofilmes mais antigos possuem maior tolerância a antibióticos (SHARMA et al, 2019).

Os biofilmes bacterianos representam um grave problema à saúde mundial, pelas suas habilidades de permanência, o que contribui para infecções crônicas persistentes. Conforme descrito, em uma revisão, por Jamal et al. (2018), os biofilmes tornaram-se um grande problema na área médica, devido à capacidade de atribuir alta tolerabilidade a antibióticos e ao sistema imune do hospedeiro. É estimado que, aproximadamente, 80% das infecções bacterianas humanas (associadas e não associadas a dispositivos) são originadas por biofilmes bacterianos. Essas infecções são profundamente complicadas de tratar, por causa da extrema proteção às células no interior do biofilme.

Ainda nesta revisão, os autores resumiram as infecções relacionadas a dispositivos médicos mais recorrentes no âmbito hospitalar, como: 2% para implantes mamários; 2% para próteses articulares; 4% para válvulas cardíacas mecânicas; 10% para derivações ventriculares; 4% para marcapassos e desfibriladores, e cerca de 40% para aparelhos ventriculares (JAMAL et al., 2018). Essas infecções possuem como única alternativa de tratamento a remoção dos

implantes, o que não só eleva o custo terapêutico, como também resulta em um transtorno para os pacientes (COSTERTON et al., 2005).

No que diz respeito a infecções não associadas a dispositivos, Mirzaei e colaboradores (2020) examinaram na literatura as principais infecções por biofilme relacionadas ao tecido hospedeiro, as quais são frequentemente crônicas. Dentre elas estão incluídas: infecções pulmonares crônicas de pacientes com fibrose cística, feridas crônicas, placa dentária, infecções recorrentes do trato urinário, prostatite crônica, endocardite infecciosa, periodontite, fasciite necrosante, amigdalite, osteomielite, cálculos renais infecciosos, otite média.

### **3.2 Diversidade microbiana e produção de metabólitos bioativos**

O conhecimento dos benefícios obtidos pelo uso dos produtos naturais são explorados pelos seres humanos há milênios. Diversos medicamentos e compostos com atividade biológica foram desenvolvidos a partir de plantas, animais e microrganismos. Embora inúmeros fármacos sintéticos (que apresentam base produtos de origem biológica), é perceptível que a natureza se conserve como uma rica fonte de novos elementos, com estruturas únicas e novos grupos químicos (NEWMAN; CRAGG, 2020). Deste modo, os produtos naturais oriundos de microrganismos exercem um papel importante no desenvolvimento de novas moléculas terapêuticas.

A bioprospecção demonstrou a relevância de diversos organismos dos mais variados ambientes, como fontes de compostos bioativos. Dentre esses novos biocompostos se destacam os microrganismos produtores de metabólitos secundários (MS). Essas biomoléculas de baixo peso molecular se apresentam em diversas classes químicas. Diferentemente dos metabólitos primários, que são necessários para a sobrevivência do seu produtor, estes produtos não são essenciais para o desenvolvimento do organismo. Entretanto, possuem funções importantes como defesa, tolerância a diversos estresses ambientais, simbiose, entre outras (BEATTIE et al., 2011; THIRUMURUGAN et al., 2018).

Os MS bioativos são obtidos, principalmente, por microrganismos possíveis de serem isolados da microbiota do solo, ambientes marinhos ou ambientes extremos. Os mais efetivos são isolados em nichos pouco explorados como regiões extremas (isolados da Antártida, vulcões) e microrganismos associados a plantas.

Os denominados endófitos ou epífitos vivem em relações simbióticas com a planta e são encontrados nos tecidos, estruturas internas e nas superfícies do hospedeiro. Nas duas últimas décadas, a influência dos compostos encontrados de endófitos e, mais recentemente, epífitas de plantas, torna-se mais evidente como novos agentes terapêuticos. Estudos apontam resultados desses biocompostos como antitumorais, embora também possam ser encontrados agentes antimicrobianos, particularmente de epífitas (CONRADO et al., 2022; NEWMAN e CRAGG, 2020).

As bactérias epífitas podem ser isoladas da superfície de folhas, raízes, entre outros fitoplanos, sem perturbar ou cortar a superfície. As epífitas são obtidas simplesmente colocando a superfície não esterilizada de uma folha, ou outro tecido da superfície da planta, em meios de crescimento adequados. A produção de metabólitos epifíticos pode estar relacionada de pelo menos duas maneiras: sintetizando metabólitos microbianos, originalmente, assimilados como sendo da planta; e/ou produzindo agentes químicos que podem modificar a síntese de compostos gerados por endófitos ou mesmo outras epífitas (NEWMAN e CRAGG, 2020).

Os microrganismos associados à plantas, geralmente produzem metabólitos secundários com atividades antagônicas e estão distribuídos em diversas espécies, incluindo bactérias ou fungos que foram colonizados nos tecidos das plantas. Estudos contabilizam que 200 gêneros de 16 filos de espécies bacterianas foram encontrados como associados a endófitos e, entre eles, a maior parcela, das espécies, fazem parte dos filos Actinobacteria, Proteobacteria e Firmicutes (GOLINSKA et al., 2015).

A composição de espécies nas comunidades da filosfera é alta em regiões temperadas e, em particular, subtropicais e tropicais. Esta diversidade de microrganismos é estabelecida por fatores ambientais incluindo radiação, poluição e fertilização nitrogenada, bem como fatores bióticos, como idade da folha e presença de outros microrganismos. A variedade de bactérias comensais compreende tanto as bactérias Gram-positivas, quanto as Gram-negativas como *Achromobacter*, *Acinetobacter*, *Agrobacterium*, *Bacillus*, *Brevibacterium*, *Microbacterium*, *Pseudomonas*, *Xanthomonas* etc. (SUN et al., 2013; VORHOLT, 2012).

Como citado anteriormente, esses metabólitos desempenham variadas funções nos microrganismos: sinalizadores químicos para comunicação, para defesa ao habitat ou para inibir o crescimento de competidores. A evolução da biossíntese

desses compostos por microrganismos deve-se à sua exposição a ecossistemas complexos. Devido a essas propriedades desenvolvidas os microrganismos são cogitados como fontes inexploradas para moléculas promissoras, com atividade antimicrobiana.

Diversas biomoléculas descobertas têm proporcionado benefícios em variadas áreas da sociedade. Dados anteriores mostram que entre os 500.000 compostos descritos, cerca de 70.000, entre eles, foram obtidos de microrganismos e em torno de 33.500 são produtos bioativos dos quais 47% são de origem fúngica (CONRADO et al., 2022). Os actinomicetos endofíticos demonstram ser a fonte promissora de moléculas bioativas. Até o momento, mais de 140 gêneros de *Actinomyces* foram relatados e alguns, entre esses, produziram a maioria dos antibióticos conhecidos. Um actinomiceto endofítico de *Cinnamomum* sp., apresentou potencial atividade antibacteriana contra vários patógenos de teste, dentre eles, *P. aeruginosa* (ROY; BANERJEE, 2015; PRASHITH, 2016 ).

Singh et al. (2017), em uma revisão, relataram que bactérias associadas a plantas foram localizadas em diversos ambientes como: trópicos, aquáticos, xerofíticos, desertos, Antártica, florestas tropicais, manguezais, entre outros. Os simbiontes bacterianos possuem inúmeras aplicações potenciais na descoberta farmacoterapêutica, principalmente, os metabólitos secundários antimicrobianos. Ecomicina, pseudomicinas e cacadumicinas são alguns dos novos antibióticos sintetizados por bactérias endofíticas. Esses compostos antimicrobianos atenuam a resistência a múltiplas drogas (MDR) em diversos agentes patogênicos (SUNKAR; NACHIYAR, 2012).

Nos últimos anos, descobriu-se que diversas espécies bacterianas oriundas de ambientes polares e os seus metabólitos possuem atividade antitumoral e antibacteriana. A bioatividade antibiótica da bactéria antártica *Janthinobacterium* sp. foi evidenciada, contra bactérias Gram-negativas multirresistentes, por Asencio et al. (2013), enquanto das 259 cepas isoladas de amostras coletadas no solo antártico e nas águas do Oceano Sul, por Ding et al. (2014), 11% delas apresentaram elevado potencial antitumoral. Esses resultados comprovam que os microrganismos oriundos de ambientes extremos representam ser potenciais candidatos, para pesquisa de metabólitos bioativos.

Nos microrganismos, rotas complexas de biossíntese decorrem da regulação de genes, enzimas, substratos, cofatores e intermediários para gerar produtos finais.

Os metabólitos secundários são constituídos, principalmente, por policetídeos, peptídeos não ribossomais (NRPs), peptídeos ribossomais, terpenos, derivados de chiquimato e produtos que resultaram de vias mistas. Um grupo emergente de MS são os peptídeos pequenos, caracterizados como peptídeos sintetizados ribossomicamente e modificados pós-traducionalmente (RiPPs). Os terpenóides são provenientes de estruturas orgânicas produzidos pela via do mevalonato, isopentenil difosfato (IPP) e dimetilalil difosfato (DMAPP) (PFANNENSTIEL; KELLER, 2019).

### **3.3 Bioatividade de metabólitos secundários bacterianos**

Os medicamentos antibacterianos foram introduzidos na terapia medicinal há mais de 70 anos, e desde então tornaram-se fundamentais no panorama atual da saúde. Entretanto, a resistência antimicrobiana (RAM) avança cada vez mais, em escala global, e coloca em risco os benefícios gerados na área da saúde, pelos antibióticos (VENTOLA, 2015). A resistência antibacteriana não se restringe apenas aos pacientes que desenvolvem infecções bacterianas, mas afeta os pacientes imunocomprometidos e procedimentos médicos mais amplos (TEILLANT et al., 2015). Atualmente, *S. aureus* e *P. aeruginosa* são consideradas cepas de prioridade alta e crítica, respectivamente, para estudos e desenvolvimento de novos tratamentos, segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS, 2021).

Embora estratégias alternativas de tratamento tenham surgido como os novos antimicrobianos adjuvantes, avibactam em combinação com ceftazidima (Avycaz da Actavis, 2015) e o relebactam combinado com imipenem/cilastatina (Recarbrio da Merck, 2020); e outros se encontram em diferentes etapas de ensaios clínicos, vale ressaltar que desde a década de 1960 surgiram somente dois novos grupos de antibióticos. Além disso, a mortalidade ocasionada por esses patógenos resistentes se mantém elevada e o sucesso do tratamento é ainda desafiador (LAWS et al., 2019; TURNER et al., 2019).

Em contraste, durante a última década, os compostos naturais cresceram largamente como fontes de produtos terapêuticos, em destaque bactérias e fungos, os quais se apresentam como as principais fontes para a descoberta de novos antibióticos. Nesse panorama, em especial, os antimicrobianos foram uma das biomoléculas mais aprovadas para aplicações farmacêuticas. Os microrganismos



são caracterizados como produtores de biomoléculas com atividade antibacteriana, antifúngica e citotóxica.

### 3.4 Metabólitos bacterianos com atividade antibiótica e antibiofilme

Os metabólitos antimicrobianos de bactérias associadas a plantas, se transformaram em uma opção alternativa para combater a resistência aos antibacterianos. Mais de 200 gêneros, de 16 filos de linhagens bacterianas foram identificados como associados a endófitos e, curiosamente, a maioria das espécies representam os filos Firmicutes (inclusive *Bacillus*), Actinobacteria, Proteobacteria (DANQUAH et al, 2022).

Existem alguns antibióticos sintetizados por bactérias, especialmente, a partir de Actinomicetos (*Streptomyces*) como estreptomicina, tetraciclina, cloranfenicol, eritromicina, viomicina, lincomicina, meropenem e daptomicina, os quais são extensamente utilizados em terapias antimicrobianas (HUTCHINGS et al., 2019; WIBOWO et al., 2023).

No entanto, também são produzidos antibióticos a partir de outros gêneros de bactérias como: a gramicidina A de *Bacillus*, a colistina de *Paenibacillus*, a mupirocina de *Pseudomonas*, e o aztreonam, um antibiótico monobactâmico obtido por síntese com base na estrutura do composto produzido por *Chromobacterium violaceum*. A síntese de metabólitos secundários com essas propriedades garantem a sobrevivência desses microrganismos em condições ambientais diversas.

Compostos isolados de bactérias possuem funções antimicrobianas, contra bactérias clinicamente resistentes incluindo *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *Micrococcus luteus*, *Bacillus subtilis* e *Enterococcus faecalis* (DANQUAH et al, 2022). Asencio et al. (2014) encontraram um extrato etanólico de *Janthinobacterium* sp. demonstrando atividade antibiótica, contra as bactérias multirresistentes *P. aeruginosa* e *Acinetobacter baumannii* produtoras de carbapenemase. Bibi et al. (2021) coletaram 144 cepas bacterianas, isoladas de esponjas marinhas, e encontraram 19 cepas exercendo atividade antibacteriana contra patógenos humanos (*S. aureus* resistente à meticilina ATCC 43300, *P. aeruginosa* ATCC 27853, *E. coli* ATCC 8739, *E. faecalis* ATCC 29212).

A maior parte das bactérias em simbiose sintetiza distintos tipos de antibióticos. Evidências anteriores relatam que bactérias associadas a organismos marinhos produzem metabólitos secundários designados aos hospedeiros. A síntese de tais biomoléculas, por bactérias marinhas, revela um futuro próspero para o desenvolvimento de novas substâncias naturais, inclusive com potencial antimicrobiano. Estudos apontam que bactérias marinhas simbióticas registram, cada vez mais, como uma fonte promissora de compostos bioativos.

Os metabólitos secundários sintetizados por bactérias apresentam além de potente atividade antibacteriana, mas também ação antibiofilme. Bactérias Gram-positivas e Gram-negativas utilizam sistemas de comunicação célula a célula como sensores de reconhecimento de *quórum*, para mediar a expressão de genes em resposta à densidade celular. N-acil-homoserina lactonas são um grupo de compostos sinalizadores associados na detecção de *quórum* bacteriano. *Rhodococcus erythropolis* cepa R138 exibiu um efeito anti-virulência, sobre o patógeno humano *P. aeruginosa* PA14 degradando N-acil-homoserina lactonas (BARBEY et al., 2018).

Somado a isso, os metabólitos bacterianos antárticos se destacam com grande potencial contra a formação de biofilme, o que é de grande importância para diferentes aplicações incluindo a área médica, industrial e ambiental. Por exemplo, Leyton et al. (2015) apontaram que 30% dos isolados bacterianos antárticos (de um total de 67 linhagens) inibiram, expressivamente, o biofilme de *Flavobacterium psychrophilum* (que acomete criatórios de salmões e trutas) por meio de proteínas (48–56 kDa) secretadas por cepas de *Pseudomonas fragi*.

### 3.4.1 Metabólitos secundários sintetizados por Firmicutes

O gênero *Bacillus* é um dos principais membros do filo Firmicutes. Espécies de *Bacillus* também são frequentemente isoladas de amostras de sedimentos marinhos, lagos salinos e água do mar. Estas bactérias têm ganhado atenção nos últimos anos, por ser encontrada em diversos habitats e por suas características fisiológica, bioquímica e molecular, se destacando com alta capacidade em aplicações biotecnológicas. As macrolactinas são lactonas naturais de 24 compostos, geralmente são produzidas por *Bacillus* spp. marinhos, mostrando atividades antibacterianas, anticancerígenas e antivirais. Algumas dessas moléculas

exibiram forte atividade antibiótica, contra os patógenos *B. subtilis*, *S. aureus*, *E. coli*, com um valor MIC (Minimum Inhibitory Concentration) de 0,1 µg/mL (STINCONE; BRANDELLI, 2020).

Pournejati et al. (2019) descobriram que os aminoglicosídeos produzidos pela linhagem RP137, de *Bacillus velezensis*, possui como alvo os ribossomos bacterianos, em especial a inibição da síntese de proteínas e o extrato purificado, S-137-R, exerceu efeito antibiótico moderado em *S. aureus* e *P. aeruginosa*.

Tomova e colaboradores (2016) identificaram um metabólito proteico de *Enterococcus* sp., isoladas de viveiros de pinguins, e representantes do filo Firmicutes. Como resultado, mostraram um marcante efeito contra cepas multirresistentes de *C. albicans*, *Bacillus* sp. e *Esporosarcina* sp. Estes autores, ainda relataram que cepas isoladas de solos antárticos demonstraram atividade contra bactérias Gram positivas (*B. subtilis*, *B. cereus*, *S. lutea* e *S. aureus* resistente à meticilina) e bactérias Gram negativas (*P. aeruginosa*, *E. coli* e *A. johnsonii*).

Ademais, os compostos antárticos apresentam potencial de inibir outros patógenos não humanos incluindo patógenos de plantas. Uma cepa de *Bacillus* sp., integrante do filo Firmicutes foi isolada de água marinha da Antártica, e exibiu forte atividade antifúngica sobre vários fungos fitopatogênicos inclusive *Paecilomyces variotii*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Fusarium oxysporum*, *Trichoderma viride*, *Rhizoctonia solani* Kühn, *Alternaria longipes* e *Sclerotinia sclerotiorum* (GUO et al., 2015).

Makuwa e Serepa-Dlamini (2021) isolaram onze bactérias associadas à superfície de raízes e tecidos foliares, da planta medicinal *Dicoma anomala*. Os gêneros identificados foram *Bacillus* com cinco cepas e *Staphylococcus* com duas cepas. Os extratos brutos de sete endófitos bacterianos demonstraram atividade antibiótica, sobre cinco cepas patogênicas: *E. coli* (ATCC 25922), *Bacillus cereus* (ATCC 10876), *S. aureus* (NCTC 6571), *P. aeruginosa* (ATCC 27853) e *Klebsiella oxytoca* (ATCC 13182) com concentração inibitória mínima compreendida entre 0,312 mg/ml a 0,625 mg/ml.

Peptídeos com carga positiva, isolados do gênero *Bacillus*, foram relatados com atividade antibiótica apresentando capacidade em se unir aos envelopes bacterianos externos, atravessar as membranas bacterianas e, assim, alcançar o citoplasma. Algumas cepas de *Serratia marcescens* sintetizam prodigiosina (pigmento vermelho antibacteriano) que inibe bactérias Gram-positivas - *S. aureus*,

*Staphylococcus saprophyticus*, *Enterococcus avium*, *Streptococcus pyogenes* e com efeito bacteriostático sobre *E. coli*. Além disso, *S. marcescens* também mostrou produzir duas classes de biossurfactantes, lipopeptídeos e glicolipídios. O grupo de lipopeptídeo exibiu atividade antimicrobiana sobre *P. aeruginosa*, *S. aureus* e *Cryptococcus neoformans* (CLEMENTS et al., 2019; DARSHAN e MANONMANI, 2015).

Prieto et al. (2012) detectaram atividade antimicrobiana contra *S. aureus*, *E. coli* e *S. typhi*, de *Bacillus pumilus* isolado de algas verdes (*Ulva* spp.). Ismail-Ben Ali et al. (2012) relataram a atividade biológica de uma cepa isolada de alga vermelha (*Jania rubens*) identificada como *B. pumilus*, contra *P. aeruginosa*, *S. typhi*, *S. aureus*, *E. faecalis* e *C. albicans*. Hasan et al. (2009) coletaram amostras de solo e encontraram a espécie *B. pumilus* como microrganismo ativo contra *S. aureus* ATCC 6538. Ismael et al. (2016) relataram atividades antibacterianas de bactérias epífitas isoladas de *Padina pavonica* (cauda de pavão) localizada na costa norte da Tunísia. Dentre os 18 isolados obtidos, o isolado P8 intimamente relacionado a *B. pumilus* foi a cepa com maior espectro de inibição do crescimento de *E. coli*, *Micrococcus* sp., *Salmonella typhimurium*, *S. aureus*, *Streptococcus* sp. e *C. albicans*.

Um estudo identificou que *Bacillus* sp. QSI-1 impede a virulência de *Aeromonas hydrophila* YJ-1 reduzindo, drasticamente, a expressão de fatores como hemolisina, protease e N-Acil-homoserina lactonas (ZHOU et al., 2019). *Bacillus subtilis* é bem conhecido por seu arsenal de moléculas antimicrobianas contra várias bactérias patogênicas. Erega e outros (2021) investigaram a capacidade do isolado natural de *B. subtilis* PS-216 contra *C. jejuni* em biofilmes multiespécies. Como resultado, identificaram que *B. subtilis* PS-216 é um forte antagonista contra a adesão de *C. jejuni* a superfícies abióticas, formação de biofilmes e interrompeu biofilmes pré-estabelecidos de *C. jejuni*.

As propriedades antiaderentes dos extratos de *B. subtilis* foram identificadas como lipopeptídeos, ou seja, como biossurfactantes, por Moryl et al. (2015). Por exemplo, a surfactina além de atuar como antiadesivo, também dispersa biofilmes de cepas de *S. aureus*, *E. coli*, *S. enterica*, *P. mirabilis*, a bactéria de deterioração *Shewanella putrefaciens* e diferentes bactérias uropatogênicas (CAULIER et al., 2019; DENG et al, 2017; LIU et al., 2019; MORYL et al., 2015). Outras moléculas extracelulares produzidas por *B. subtilis* como  $\alpha$ -amilase (*B. subtilis* S8-18 de origem marinha) e bacteriocinas inibem biofilmes de *S. aureus* (MRSA), *V. cholerae*, *P.*

*aeruginosa*, *S. epidermidis* e formação de biofilme de *E. coli* (KALPANA et al, 2012). Recentemente, Erega e outros (2022) detectaram que as moléculas antibióticas (bacillaene e bacilisina) sintetizadas por *B. subtilis* impediram a formação de biofilme de *C. jejuni*.

Bactérias ácido lácticas (BAL) também apresentam a capacidade de produzir compostos antimicrobianos (bacteriocina, ácidos orgânicos, diacetil e peróxido de hidrogênio), que atuam contra bactérias nocivas. As bacteriocinas são polipeptídeos de baixo peso molecular produzidos em ribossomos e abrangem de 20 a 60 resíduos de aminoácidos. A produção de bacteriocina por *Lactobacillus pentosus* ST712BZ, isolado de boza (bebida fermentada dos Balcãs), impede o crescimento de *Lactobacillus casei*, *E. coli*, *P. aeruginosa*, *E. faecalis*, *K. pneumoniae* e *Lactobacillus curvatus* (DANQUAH et al, 2022).

Rodrigues e colaboradores (2020) investigaram a atividade antimicrobiana do inóculo e de metabólitos produzidos por *Lactobacillus fermentum* TcUESC01 isolado de fermentações espontâneas de cacau originário da região da Bahia-BR, contra *Streptococcus mutans* UA159. Como resultado, relataram que substâncias sintetizadas, pelo *L. fermentum* TcUESC01, possuem grande potencial como agente antimicrobiano contra *S. mutans*, exibindo antiaderência do biofilme e atividade bactericida contra células planctônicas da bactéria. Rather et al. (2023) avaliaram o potencial antimicrobiano de extratos de metabólitos de *Lactobacillus* (KAU007, KAU0010, KAU0021) isolados de leite de camelo e de tâmaras fermentadas, na Arábia Saudita. O resultado do estudo mostrou que a cepa KAU0021 (isolado de tâmaras) foi a mais bioativa contra biofilmes mono e polimicrobianos formados por *C. albicans* e *S. aureus*.

Outros estudos recentes verificaram que o biocomposto (3-Benzil-hexahidropirrol[1,2-a]pirazina-1,4-diona) extraído de *Exiguobacterium indicum* SJ16 isolada da rizosfera de *Cyperus laevigatus*, bloqueia a formação de biofilme de duas cepas de *P. aeruginosa*, PAO1 e PAH. Além disso, o composto é capaz de conter a motilidade e a síntese de fatores de virulência e mediadores responsáveis pela detecção de *quórum* como piocianina, ramnolipídio, elastase e protease (SINGH et al., 2019).

#### **3.4.2 Metabólitos secundários sintetizados por Actinomicetos**

Investigações antárticas evidenciaram resultados positivos de agentes bioativos antimicrobianos oriundos de Actinobacteria. Foram identificadas, em cepas de *Arthrobacter* sp., potencial produção de compostos ativos contra uma larga gama de patógenos humanos incluindo: *P. aeruginosa*, *M. luteus*, *Acinetobacter johnsonii*, *Candida* sp., *Cryptococcus* sp., *Listeria* spp. e *Brochothrix thermosphacta* (TOMOVA et al., 2015). Além disso, *Nocardioides* sp. (Actinobacteria) obtidos do solo antártico exibiram atividade antimicrobiana contra *S. aureus* e *B. subtilis*. Análises prévias mostraram que os compostos com bioatividade produzidos por esta linhagem são principalmente glicolipídios e/ou lipopeptídeos (NÚÑEZ-MONTERO; BARRIENTOS, 2018).

Ainda nessa perspectiva, isolados de actinobactérias, de solos vulcânicos da Antártica e outras de espécies marinhas, expressaram atividade inibitória contra *Salmonella enterica* sorotipo Paratyphi e *S. enterica* sorotipo Enteritidis. De fato, verificou-se que novas espécies apresentam, ao menos um dos genes biossintéticos, codificadores de policetídeos sintases e os peptídeos não ribossômicos sintetases envolvidos na produção desses metabólitos secundários (UNDABARRENA et al., 2016).

Actinobactérias obtidas de regiões na Índia pouco exploradas, foram estudadas quanto à sua capacidade antimicrobiana sobre bactérias causadoras de meningite formadoras de biofilme, na forma de nanopartículas (NPs). Neste estudo, realizado por Bano e outros (2023), metabólitos secundários isolados de cepas de Actinomicetos, *Microbacterium proteolyticum* LA2(R) e *Streptomyces rochei* LA2(O), foram utilizados para produção de nanopartículas de prata (AgNPs). Como resultado, essas NPs demonstraram atividades antibacteriana e antibiofilme contra bactérias causadoras de meningite. Além disso, a produção de biofilmes foi inibida por essas nanopartículas em *S. pneumoniae*, *H. influenzae* e *N. meningitidis* em 73%, 71% e 64%, respectivamente.

Xie e colaboradores (2019) identificaram três cepas, da biblioteca de 185 Actinomicetos (TRM 46200, TRM 41337 e TRM 46814) com inibição significativa contra formação de biofilme de *S. epidermidis* (ATCC 35984 e uma cepa clínica 5-121-2), sem afetar o crescimento de células planctônicas. Além disso, sugeriram que compostos hidrofílicos, possivelmente peptídeos extracelulares ou proteínas dessas três cepas, conferem a redução do biofilme em *S. epidermidis*. Após investigar, descobriram que as proteínas brutas distribuídas no meio, das três

linhagens, não deterioram apenas exopolissacarídeos, mas também DNA extracelular no biofilme de *S. epidermidis*.

Estudos constataram ainda, que as condições de cultivo influenciaram a atividade de inibição de algumas cepas de actinomicetos, testadas contra formação de biofilme de *Streptococcus pneumoniae* e *P. aeruginosa*. Os extratos de actinomiceto sólido TB12 isolado de sedimento de lago, mostrou atividade elevada contra ambas as bactérias patogênicas, enquanto o SW12 (isolado de sedimento de campo de arroz) exibiu maior atividade apenas contra *S. pneumoniae*. Os extratos líquidos das duas linhagens, CW17 e CW01 (isolados de sedimentos de rio), apresentaram maior atividade de inibição apenas contra *S. pneumoniae*. Enquanto isso, o extrato líquido do isolado SW03 (isolado de sedimento de campo de arroz) mostrou maior atividade de inibição do antibiofilme contra a bactéria Gram-negativa *P. aeruginosa*, mas não contra *S. pneumoniae* (MICHAEL; WATURANGI, 2023).

Os Actinomicetos endofíticos produzem diversas substâncias químicas com estruturas singulares de relevante interesse medicinal, principalmente antimicrobianos (DANQUAH et al, 2022). Santos e outros (2019) encontraram resultados positivos em Actinomicetos extraídos de esponjas, que produziram relevantes metabólitos com atividade antimicrobiana. *Mycobacterium* sp. Berg02-79 apresentou atividade antibacteriana contra *S. aureus* resistente à metilina. Um extrato obtido do pigmento metanólico, da espécie marinha *Micrococcus* sp. MP76 foi relatado como bacteriostático contra *S. aureus*, *P. aeruginosa* e *E. coli* (KARBALAEI et al., 2020). Zhang et al. (2020) descreveram um novo e eficaz composto antibiofilme, maipomicina A (MaiA), que foi isolado dos metabólitos de uma rara cepa de Actinomiceto marinho, *Kibdelosporangium phytohabitans* XY-R10. Esta substância exibiu um amplo espectro de atividades antibiofilme contra as bactérias Gram-negativas *A. baumannii* e *P. aeruginosa*.

*Streptomyces* é um gênero de Actinobactérias largamente encontrado em ambientes marinhos. Srinivasan et al. (2021), em uma revisão, investigando os trabalhos dos últimos 25 anos, identificaram durante a pesquisa que 148 cepas foram isoladas e 23 delas com diferentes linhagens de Actinobactérias marinhas, apresentaram resultado positivo para atividade antibacteriana contra *B. subtilis*, *E. coli*, *K. pneumoniae* e *S. aureus*. Park et al. (2016) empregaram ensaios de triagem de alto rendimento (HTS) baseados em fluxo estático, para rastrear inibidores de biofilmes de *A. baumannii*. A pesquisa partiu de uma biblioteca de extratos de

produtos naturais derivados de microrganismos marinhos. A análise de extratos derivados de *Streptomyces gandocaensis* resultou na descoberta de um metabólito peptídico denominado cahuitamicina C, com forte atividade contra biofilme.

Outro estudo revelou a eficácia antibacteriana de *Streptomyces* sp. 1492 contra patógenos bacterianos resistentes a medicamentos como *E. faecium*, *S. aureus* e *A. baumannii*. Katz e Baltz (2016) averiguaram que as bactérias representantes do filo Actinobacteria, de ambientes marinhos, possuem a capacidade de sintetizar cerca de 30 a 50 metabólitos secundários, destacando-as como uma importante fonte de compostos naturais.

*Streptomyces* também está, frequentemente, entre os isolados de Actinomicetos endofíticos. Alguns compostos de importância biológica foram isolados de *Streptomyces* sp., incluindo munimbicinas (contra *Vibrio cholerae*), ácido tereftálico (contra *S. aureus*), cletramicina (contra *Cryptococcus neoformans*), capreomicina (contra *Micoplasma*), saadamicina (contra *Campylobacter jejuni*), cacadumicina A e hipericina (ambas contra *Shigella* sp.) (GOLINSKA et al., 2015; SINGH et al., 2017).

Recentemente, um trabalho identificou que a substância bioativa, juglomicina A, sintetizada por *Streptomyces achromogenes* E91CS4 endófito de *C. sativus*, previne a formação de biofilme em *E. coli* impedindo sua motilidade e inibe seu mensageiro de adesão gene *fimH*. Além disso, juglomicina A também bloqueia o crescimento de outras bactérias como *Shigella dysenteriae*, *Pseudomonas fluorescens*, *Streptococcus pyogenes*, *S. aureus*, *Staphylococcus warneri* e *Clostridium pasteurianum* (AHMAD et al., 2020).

Singh e Dubey (2020) identificaram uma nova linhagem de Actinobactéria endofítica (*Streptomyces californicus* cepa ADR1) isolada da planta *Datura metel*, que produziu metabólitos secundários com potentes atividades antimicrobianas. Os compostos inibiram a formação de biofilme pelas cepas de *S. aureus* e MRSA. Os policetídeos de piranonaftoquinona (PNQ) são uma subclasse de policetídeos bacterianos (oriundos de *Streptomyces*) tipo II que se apresentam com resultados bem sucedidos, como antimicrobianos.

Kemung e outros (2020) relataram um extrato metanólico de *Streptomyces* sp. cepa MUSC 125 de solo de mangue na Malásia com atividades antibiofilme e antioxidante contra *S. aureus* resistente à meticilina (MRSA). Oja et al. (2015) avaliaram o potencial de alnumicinas, recentemente isoladas de *Streptomyces albus*,



e outros policetídeos de piranonaftoquinona (PNQ) estreitamente relacionados contra biofilmes de *S. aureus*. Constatou-se que a granaticina B (policetídeo) e a alnumicina D são quase igualmente ativas contra células de biofilme de *S. aureus* ATCC 25923.

Outro estudo, realizado por Bano et al. (2022), avaliou a bioatividade de metabólitos secundários sintetizados por Actinobactérias isoladas do solo rizosférico de *Rauwolfia serpentina*, quanto à sua atividade antimicrobiana e antibiofilme. Entre as 29 colônias bacterianas isoladas apenas uma se destacou como um novo isolado, *Microbacterium* LA2(R). O tratamento com o composto diminuiu a formação de biofilme em 70%–80% contra cepas patogênicas (*E. coli*, *S. aureus*, *K. pneumoniae* e *Salmonella abony*).

Michael e Waturangi (2023) cultivaram bactérias endofíticas, cepas de *Vibrio cholerae* e actinomicetos em meio líquido e sólido, e utilizaram os extratos de ambas as condições e compararam as atividades antibiofilme dos compostos, contra diversas bactérias patogênicas. No geral, isolados de bactérias endofíticas e cepas de *V. cholerae* mostraram maior atividade de inibição contra *Vibrio parahaemolyticus*, *P. aeruginosa*, *E. faecalis*, *V. cholerae* e *E. coli* enterotoxigênica, quando incubados em cultura líquida.

### 3.4.3 Metabólitos secundários sintetizados por Proteobactérias

Diversas seleções para metabólitos secundários identificaram que 14 de 57, das espécies do filo Proteobacteria, isoladas de solos antárticos, produzem um extrato bruto extracelular que é fortemente bioativo contra *S. aureus* (DANILOVICH et al., 2018). Cepas do gênero *Pseudoalteromonas*, do ambiente antártico, exibiram atividade contra *Escherichia coli* e *Proteus mirabilis* inibindo seu crescimento principalmente devido à síntese de numerosos compostos voláteis. Ainda neste estudo, os autores descreveram uma produção de formação dos agentes antimicrobianos voláteis (não estimulada pela presença de cepas alvo) indicando que a síntese dessas moléculas é uma propriedade comum para as espécies antárticas. Além disso, *Pseudoalteromonas haloplanktis* TAC125 gera uma substância sacarídica que exhibe atividade específica, contra a formação de biofilmes de cepas de *Staphylococcus epidermidis* isoladas de catéteres infectados (NÚÑEZ-MONTERO; BARRIENTOS, 2018).

O gênero *Pseudoalteromonas* é largamente encontrado no ambiente marinho. Estas bactérias Gram-negativas são conhecidas por sintetizar uma variedade de compostos com potencial biotecnológico, incluindo moléculas antibiofilme. A bactéria marinha antártica, *Pseudoalteromonas haloplanktis* TAC125, quando cultivada com um estilo de vida sésil, exibiu forte inibição na adesão de *S. epidermidis*. Recentemente, uma molécula antibiofilme produzida por *Pseudoalteromonas ruthenica* KLPp3 foi identificada como pertencente à família dicetopiperazina. Esta molécula e a alginato liase purificada (AlyP1400) sintetizada por *Pseudoalteromonas* sp. 1400 cessaram o desenvolvimento de biofilmes estabelecidos por *P. aeruginosa* (DOGHRI et al., 2020).

Os ramnolipídeos são biossurfactantes aniônicos conhecidos, normalmente produzidos por algumas cepas de *Pseudomonas* e *Burkholderia*. Esses elementos apresentam um amplo espectro de bioatividades incluindo atividades contra microrganismos, biofilme, tumores e stress oxidativo. Giugliano e colaboradores (2021) identificaram um Ramnolipídio (M15RL), sintetizado pela bactéria antártica *Pseudomonas gessardii* M15, recentemente descoberto com alta atividade antiviral contra as famílias Coronaviridae e Herpesviridae, inclusive contra o coronavírus 2 da síndrome respiratória aguda grave (SARS-CoV-2). Demais estudos relataram moléculas antibióticas, entre cepas distintas de *Pseudoalteromonas* sp. de ambientes marinhos, incluindo biomoléculas contra patógenos resistentes à metilina e grupos genéticos associados à produção e regulação de produtos antimicrobianos (MAIDA et al, 2015).

Michael e Waturangi (2023) cultivaram bactérias endofíticas, cepas de *Vibrio cholerae* e actinomicetos em meio líquido e sólido, e utilizaram os extratos de ambas as condições e compararam as atividades antibiofilme dos compostos, contra diversas bactérias patogênicas. No geral, isolados de bactérias endofíticas e cepas de *V. cholerae* mostraram maior atividade de inibição contra *Vibrio parahaemolyticus*, *P. aeruginosa*, *E. faecalis*, *V. cholerae* e *E. coli* enterotoxigênica, quando incubados em cultura líquida.

Um estudo na China verificou a capacidade de bactérias marinhas inibidoras de detecção de *quórum* (QSI), como um meio de controlar a formação de biofilmes. Em torno de 200 cepas foram isoladas do coral (*Pocillopora damicornis*) e rastreadas quanto ao seu potencial de inibir a detecção de *quórum* (QS). Como resultado, apenas o extrato de uma típica bactéria simbiótica de coral, H12- *Vibrio*

*alginoliticus*, se destacou impedindo a formação de biofilme de *P. aeruginosa* PAO1. Além disso, os metabólitos secundários de *V. alginolyticus* inibiram os fenótipos de virulência da PAO1 ao regular negativamente a capacidade de motilidade, a atividade da elastase e a produção de ramnolipídeos. Análises de espectrometria apontaram que o potencial composto bioativo envolvido seria o isotiocianato de rodamina (SONG et al., 2018).

#### 3.4.4 Metabólitos secundários sintetizados por outros filos

Uma diversidade de cianobactérias, na Antártida e outros ambientes polares, foi relatada por alguns autores, frisando que a busca por agentes antimicrobianos, de bactérias antárticas, possuem um futuro promissor. Algumas cepas desconhecidas e não cultivadas de cianobactérias com atividade antibiótica foram encontradas através do gene 16S ribossomal RNA (16S *rRNA*). Do total de 48 isolados 35% das cepas apresentaram atividade contra *S. aureus*, ou aos fungos *Aspergillus fumigatus* e *Cryptococcus neoformans*, usando acetato de etila e extratos brutos de metanol. Bioatividade contra *Mycobacterium tuberculosis*, *S. aureus*, *Salmonella typhi*, *P. aeruginosa*, *Enterobacter aerogenes* e espécies multirresistentes de *E. coli* também foi relatada sobre os extratos destas linhagens (NÚÑEZ-MONTERO; BARRIENTOS, 2018).

Além disso, uma cepa de *Pedobacter* sp., um membro do filo Bacteroidetes, foi relatada como produtora de compostos capazes de inibir patógenos humanos (*E. coli*, *S. enterica*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter cloacae* e *B. cereus*). Notavelmente, em uma triagem de grande rendimento para bioatividade antibiótica, 675 cepas foram isoladas de esteiras bentônicas, em regiões antárticas diferentes e 18% foram ativas contra pelo menos um dos patógenos (*S. aureus*, *Enterococcus faecium* e *E. coli*). Algumas das bactérias ativas pertenciam aos filos Actinobacteria e Proteobacteria (NÚÑEZ-MONTERO; BARRIENTOS, 2018).



## CAPÍTULO I



O texto completo do capítulo 1, que no texto completo da dissertação defendida ocupa o intervalo de páginas compreendido entre as páginas 47 – 75, foi suprimido por tratar-se de manuscrito em preparação para publicação em periódico científico.

Aborda a busca de compostos ativos produzidos a partir de microrganismos isolados do ambiente antártico, contra biofilmes de bactérias patogênicas, das espécies *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 e *Staphylococcus aureus* ATCC 6538. A metodologia utilizada consistiu no cultivo destas bactérias para obter o sobrenadante para posterior extração líquido/líquido. Ensaio foram realizados para quantificar o crescimento bacteriano e a inibição da formação de biofilme. As amostras mais ativas foram particionadas em extração em fase sólida para identificação química e estrutural das moléculas. O teste de toxicidade em invertebrados foi realizado com as frações particionadas mais ativas contra ambas as bactérias patogênicas.





## 2. MATERIALS AND METHODS

### 2.1 Collection of samples and cultivation conditions

Bacteria from the collection of the Laboratory of Biofilms and Microbial Diversity (UFRGS, authorization SISGEN A40B4A1) collected in the Wanda Glacier (Antarctic Peninsula), previously isolated and maintained at -20 °C in Skim Milk liquid medium, were cultivated on R2A agar plates, for 48 hours, at room temperature. R2A medium is specially designed to promote the growth of aerobic, heterotrophic microorganisms that are adapted to stressful environments with low nutrients. Seven microorganisms isolated from this collection were used for metabolite production and screening for antibiofilm and antibacterial activity. From the cultivation of the isolates on agar plates, bacterial suspensions were made in 0.9% saline solution (OD 600 = 0.150). Subsequently, the isolates were subjected to growth for the production of metabolites in R2A liquid medium for five days at 20 °C in constant agitation at 150 rpm, in 250 mL erlenmeyer flasks by adding 50 mL of R2A culture medium and 1 mL of bacterial suspension. After this period of cultivation, the bacterial culture was centrifuged at 9,000 rpm for 30 minutes at 4 °C to remove excessive culture medium and the supernatant was kept at -20 °C.

The obtained supernatant was subjected to liquid-liquid extraction (LLE) with organic solvents. Such solvents were used in the extraction method in order of their polarity, in increasing order. The order of solvents used was hexane, dichloromethane, ethyl acetate, in a 1:1 ratio (supernatant volume:solvent volume). Then, these solvents were evaporated under reduced pressure, the extract was frozen and then lyophilized. The most active extracts of the N52R1 strain were applied to C18 reversed phase cartridges (Sep-Pak, Waters, Ireland), previously preconditioned with 2 mL each of methanol and ultrapure water. The 5 mg mass of the most promising extracts were diluted with methanol water (15:85) and then rinsed with 4 mL of sterile water, and the constituents were then eluted with increasing concentrations of methanol (15, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 and 100%) in water, acetonitrile (100%) and hexane (100%). Fractions of 2 mL were collected, which were dried under vacuum (SpeedVac SPD1010, Thermo Electron, USA) and

subsequently resuspended in aqueous solution (sterile water with 2% DMSO). These samples were used in biological activity assays.

## 2.2 Antibiofilm formation and bacterial growth inhibition assay

*Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 and *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 were grown overnight on Mueller Hinton agar (MH) at 37 °C. Bacterial extracts were evaluated for antibiofilm formation and bacterial growth inhibition activities of *S. aureus* (ATCC 6538) and *P. aeruginosa* (ATCC 27853). Assays were performed in sterile 96-well plates (Costar 3599, Corning Inc., USA) using a protocol adapted from Trentin et al. (2011). For assays of antibiofilm formation activity, 80 µL of bacterial suspension (standardized for absorbance of 0.15 at OD 600 nm) in sterile 0.9% saline solution, equivalent to McFarland's 0.5 scale, were added to each well (10<sup>7</sup> CFU/mL). 40 µL of TSB (Tryptic Soy Broth) culture medium were added to each well for *P. aeruginosa* and BHI (Brain Heart Infusion Broth) for *S. aureus*. 4 µL of the extract to be tested at initial concentrations of 20 µg/mL and 200 µg/mL and 76 µL of sterile ultrapure water.

For antibiotic control, the bacterial extracts were replaced by 80 µL of vancomycin (20 µg/mL) for *S. aureus* and 80 µL of gentamicin (20 µg/mL) for *P. aeruginosa*. As a positive control, 80 µL of culture of *S. aureus* and *P. aeruginosa*, 80 µL of water and 40 µL of culture medium (BHI or TSB) were used; 40 µL of culture medium (BHI or TSB), 80 µL of water and 80 µL of saline solution were also used as a negative control to evaluate the sterility of the experiment. Inhibition of bacterial growth was verified by reading the optical density at 600 nm at the time of addition of the filtrates and after incubation at 37 °C for 24 hours.

To verify the antibiofilm activity, the contents of the wells were removed and washed 3 times with saline solution. The adhered biofilm was fixed for 1 hour at 60 °C, and then stained with 200 µL of crystal violet (40%) for 15 minutes at room temperature. After washing, the remaining crystal violet was solubilized with 99% ethanol for 30 minutes, and the absorbance was measured at 570 nm. All assays were performed in quadruplicate, with experiments performed in triplicate.

## 2.3 Bacterial Identification

The most promising isolates were identified by sequencing the 16S rRNA gene. Bacterial DNA was extracted using the Qiagen DNAeasy Plant kit®. The gene was amplified by PCR using universal primers 27F, 946F, 1087R and 1492R. The sequences obtained by aligning the amplicons were compared with the sequences available in the database of the Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) and Ribosomal Database Project – MSU (RDP-II).

#### 2.4 Chemical and structural characterization of metabolites

Fractionated N52R1 strain samples were subjected to chemical evaluation using the UPLC-MS/MS technique according to De Felicio et al., (2021). H-Class (Waters, Milford, MA, USA) hyphenated to a Bruker Impact II UHR-ESI-QqTOF (Bruker Daltonics, Billerica, MA, USA) mass spectrometer. For chromatographic separation, a reversed-phase column BEH C18 (1.7 µm, 2.1 × 100 mm) was used coupled to a compatible pre-column and a solvent system of water (A), acetonitrile (B) 2% of formic acid (C) methanol (D), following the analytical method: flow rate of 0.5 ml/min; column temperature 40°C; 0–1 min, 5% B; 1–6 min, 5% B to 35% B (curve 6); 6–10 min, 35% B to 95% B (curve 1); 10–12 min, 95% B; 12–15 min, 95% D (curve 1); 15–18 min for spinal equilibration in the initial phase, C was held constant at 5% (final formic acid concentration equal to 0.1%).

The mass spectrometer operated in positive ion mode, scanning the mass in the range of 30 to 2,000 Da, with an acquisition rate of 8 Hz. End plate offset = 500 Volts (V); Vcap 4,500 V; nebulizer 4.0 bar; drying gas flow (N<sub>2</sub>) 10 L/min; drying gas temperature 200°C, followed by a MS/MS scan for the most intense ions in a cycle time of 1 s, absolute limit (per 1000 sums) of 1500 cts. As per MS2 rules, the mass ratio (m/z) below 200 Da has been excluded and the "active exclusion" function has been enabled. Each run was automatically calibrated using HCOONa (10 mM). The calibrated spectra were converted into mzXML files using Data Analysis 4.3 and included bio CompassXport tools (Bruker Daltonics, version 4.0.0.8).

Dereplication and identification of natural components of extracts and fractions of N52R1 were performed using an internal collection of scripts called NP3 Mass Spectrometry (MS) Workflow 1.1.4, as previously described (De FELICIO et al., 2021; VIEIRA et al., 2022). In this experiment, generally, the default parameters of NP3 MS Workflow were defined. The Ionization Variant Annotation Molecular

Networking (IVAMN) was used as a basis to select and exclude nodes present in samples of chromatographic blanks (BLANKS) and their first immediate neighbors. Then, the remaining nodes marked as "representative protonated" (column "representative\_protonated" equal to 1 in the node count table) were selected and filtered in the Spectra Similarity Molecular Network (SSMN).

The raw SSMN was created with a minimum cosine similarity score for an edge connection of 0.6 and filtered with a maximum component size of 200 and a maximum number of connections for a single node of 15. Building IVAMN and SSMN in Cytoscape were made with an internal python script that automates some tasks using the py2cytoscape library (De FELICIO et al., 2021). MS/MS chemical structure annotation was performed using spectral correspondences with the GNPS (WANG et al., 2016) and UNPD-ISDB (ALLARD et al., 2016) databases. Annotations were manually reviewed and related MS/MS clusters were grouped and named by the chemical groups found in the SSMN.

## 2.5 In vivo toxicity test on *Galleria mellonella* larvae

For the toxicity assay, groups of ten late-instar larvae of *G. mellonella* weighing 220–260 mg were used. Each larva was injected with 10  $\mu$ L of a 100 mg/kg solution using a 10  $\mu$ L syringe with a fixed needle (Hamilton 701N-80300). For the test, the larvae were injected into the last right proleg with bacterial extracts, which showed antibiofilm activity, diluted in sterile ultrapure water. For control were included: larvae inoculated with DMSO vehicle (positive control), larvae inoculated with vehicle (sterile water and 2% DMSO) (negative control). Each group of 10 larvae was incubated in sterile petri dishes at 37°C for up to 5 days and evaluated daily for survival. Larvae were classified as dead when they were not motile and did not respond to touch. The experiments were repeated three times, using 10 larvae per group.

## 2.6 Statistical analysis

The results presented in this study correspond to the average of triplicates. Statistically significant differences were reported when the results showed a probability of occurrence of the null hypothesis lower than 5% ( $p < 0.05$ ) applying

analysis of variance (ANOVA), followed by multiple comparisons by Dunnett's test. Analyses were performed using GraphPad Prism version 8.0.

originating seven supernatants, which were partitioned in organic solvents (hexane, dichloromethane, ethyl acetate), resting an aqueous fraction.

Figure 1.A and 1.B,

This table is mostly obscured by redaction bars. It appears to have several columns and rows. There are some white rectangular areas within the table, possibly representing data points or specific cells that are not fully redacted.

[Redacted text block]

This table is mostly obscured by redaction bars. It appears to have several columns and rows. There are some white rectangular areas within the table, possibly representing data points or specific cells that are not fully redacted.

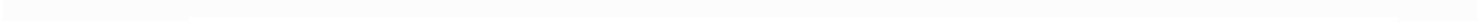
The antarctic bacterium N52R1 isolated from snow samples, was identified as *Bacillus siamensis* with 99% similarity, based on partial sequence analysis of the 16S rRNA gene. According to information obtained from the BLAST database, this group also includes the species *B. atropaeanus*, *B. amycoliquefaciens*, *B. vallismortis* and *B. vellezensis*, which cannot be distinguished from each other only by analyzing this gene. These results confirm our expectations that antarctic species, from the phylum Firmicutes, present antimicrobial activity.

According to Rabbee et al. (2019), *Bacillus* is a large and heterogeneous group of aerobic or facultative anaerobic, rod-shaped, endospore-forming bacteria that are widely distributed throughout the environment. Due to these characteristics, Fan et al. (2017) organized some *Bacillus* species under the operational group *Bacillus amyloliquefaciens* (OG Ba). Taxonomically, OG Ba belongs to the *Bacillus subtilis* species complex, family Bacillaceae, class Bacilli and phylum Firmicutes. So far, OG Ba comprises four bacterial species: *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus siamensis*, *Bacillus velezensis* and *Bacillus nakamurai*. OG Ba members produced some important antimicrobial compounds, including non-ribosomal peptides (surfactin, fengycin, bacillomycin-D, bacillisin and bacilibactin) (DUNLAP et al., 2019; RABBEЕ & BAEK, 2020).



[Redacted text block]

[Redacted text block]



[Redacted text block]

[Redacted text block]

The table consists of approximately 15 rows and 2 columns. The content is almost entirely redacted with grey bars. The following table summarizes the visible structure and content:

Row	Column 1	Column 2
1	[Redacted]	[Redacted]
2	[Redacted]	[Redacted]
3	[Redacted]	[Redacted]
4	[Redacted]	[Redacted]
5	[Redacted]	[Redacted]
6	[Redacted]	[Redacted]
7	[Redacted]	[Redacted]
8	[Redacted]	[Redacted]
9	[Redacted]	[Redacted]
10	[Redacted]	[Redacted]
11	[Redacted]	[Redacted]
12	[Redacted]	[Redacted]
13	[Redacted]	[Redacted]
14	[Redacted]	[Redacted]
15	[Redacted]	[Redacted]

Extraction in C18 cartridge

Solid phase

Solid phase extraction II

Objectives

[The content of this page is heavily redacted with grey bars, making the text illegible.]

[Redacted text block]

[Redacted text block]





Molecular network of purified from hexane fractions of the N52P1 strain

ndErrorPPIV

These two LPs were discovered in the late 1980s. Fengycin was first isolated, produced from *B. subtilis* and plipastatin from *Bacillus cereus*. The first lipopeptide was determined as an antifungal and the other as a phospholipase A2 inhibitor. There are small structural differences between these two compounds and, likewise, few differences in their biological activities (JACQUES, 2011).

Fractions with biological activity of the N52R1 strain, derived from the hexane extract, were inoculated into *G. mellonella* larvae and incubated for 5 days in a

bacteriological incubator with temperature control. Observing the survival curves generated after the experiment, they reveal that among the 13 samples, only one fraction (F13) showed toxic properties, at a concentration of 100 mg/kg (Figure 6.A). Due to this result, a lower concentration (50 mg/kg) was evaluated only for this fraction, which did not affect the survival of *G. mellonella* larvae (Figure 7.A)











[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

SHOEMAKER, S. P., PIERSON, M. D. "Phoenix phenomenon" in the growth of *Clostridium perfringens*. *Applied Environmental Microbiology*, v. 32, n. 6, p. 830-837, 1976. DOI: 10.1128/aem.32.6.803-807.1976.





## CAPÍTULO II



O texto completo do capítulo 2, que no texto completo da dissertação defendida ocupa o intervalo de páginas compreendido entre as páginas 79 – 103, foi suprimido por tratar-se de manuscrito em preparação para submissão em periódico científico.

Consta a busca de compostos com atividade antibiofilme de metabólitos secundários produzidos por duas cepas bacterianas isoladas de planta carnívora do gênero *Drosera*, contra *Staphylococcus aureus* ATCC 6538. A metodologia utilizada consistiu no cultivo destas duas cepas de bactérias e a partir do sobrenadante foram obtidos os extratos brutos por extração líquido/líquido e particionados por extração em fase sólida. Ensaio foram realizados para quantificar o crescimento bacteriano e a inibição da formação de biofilme. Análise de sequenciamento do gene *16S rRNA* foi utilizada para identificar as cepas produtoras de metabólitos bioativos. A análise *in silico* revelou o tipo de moléculas envolvidas na síntese de compostos com atividade antibiofilme. O teste de toxicidade em modelo larval de *G. mellonella* foi realizado com as frações particionadas mais ativas contra biofilme de *S. aureus*.







## 2. MATERIALS AND METHODS

### 2.1 Collection of samples and cultivation conditions

Bacteria from the collection of the Laboratory of Biofilms and Microbial Diversity (UFRGS, authorization SISGEN A40B4A1) collected from the cultivation of *Drosera*, in the coastal region of Nova Tramandai (Rio Grande do Sul), previously isolated and maintained at -20 °C in Skim Milk liquid medium, were cultivated on R2A agar plates, for 48 hours at 30 °C.

Microorganisms isolated from this collection were selected and used for the production of metabolites and tests for antibiofilm formation and antibacterial activity. From the cultivation of the isolates on agar plates, bacterial suspensions were made in 0.9% saline solution (OD 600 = 0.150). Subsequently, the isolates were submitted to growth for the production of metabolites in R2A liquid medium for five days at 25°C in constant agitation at 150 rpm, in 250 mL erlenmeyer flasks by adding 50 mL of R2A culture medium and 1 mL of bacterial suspension. After this period of cultivation, the bacterial culture was centrifuged at 9 000 rpm for 30 minutes at 4 °C to remove excessive culture medium and the supernatant was kept at -20 °C.

### 2.2 Obtaining extracts containing metabolites

The obtained supernatant was subjected to liquid-liquid extraction (LLE) with organic solvents. Such solvents were used in the extraction method in order of their polarity, in increasing order. The order of solvents used was hexane, dichloromethane, ethyl acetate, in a 1:1 ratio (supernatant volume:solvent volume). Then, these solvents were evaporated under reduced pressure, the extract was frozen and then lyophilized.

The crude extracts of the compounds, of strain BGP-320, were applied to ion exchange cartridges (Strata SCX, Phenomenex, USA), respectively, previously preconditioned with 2 mL each of methanol and ultrapure water. The 5 mg aliquots diluted with methanol/water (15:85) were then rinsed with 4 mL of sterile water, and the constituents were then eluted with increasing concentrations of methanol (15, 30, 40, 50, 60, 70 ; 80, 90 and 100%) in water, acetonitrile (100%) and hexane (100%). Fractions of 2 mL were collected, which were dried under vacuum (SpeedVac SPD1010, Thermo Electron, USA) and subsequently resuspended in aqueous

solution (sterile water with 2% DMSO). These samples were used in biological activity assays.

### 2.3 Antibiofilm formation and bacterial growth inhibition assay

*Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 and *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, all of which form biofilms, were grown overnight on Mueller Hinton agar (MH) at 37 °C. Bacterial extracts were evaluated for antibiofilm formation and inhibition of bacterial growth activities of *S. aureus* (ATCC 6538) and *P. aeruginosa* (ATCC 27853). Assays were performed in sterile 96-well plates (Costar 3599, Corning Inc., USA) using a protocol adapted from Trentin et al. (2011). For assays of anti-biofilm formation activity, 80 µL of bacterial suspension (standardized for absorbance of 0.15 at OD<sub>600 nm</sub>) in sterile 0.9% saline solution, equivalent to McFarland's 0.5 scale, were added to each well ( $10^7$  CFU/mL). 40 µL of TSB culture medium were added to each well (Tryptic Soy Broth) for *P. aeruginosa* and BHI (Brain Heart Infusion Broth) for *S. aureus*. 4 µL of the extract to be tested at initial concentrations of 20 µg/mL and 200 µg/mL and 76 µL of sterile ultrapure water.

For antibiotic control, the bacterial extracts were replaced by 80 µL of vancomycin (20 µg/mL) for *S. aureus* and 80 µL of gentamicin (20 µg/mL) for *P. aeruginosa*. As a positive control, 80 µL of *S. aureus* and *P. aeruginosa* culture, 80 µL of water and 40 µL of culture medium were used; 40 µL of culture medium, 80 µL of water and 80 µL of saline solution were also used as a negative control to evaluate the sterility of the experiment. Inhibition of bacterial growth was verified by reading the optical density at 600 nm at the time of addition of the filtrates and after incubation at 37 °C for 24 hours.

To verify the antibiofilm activity, the contents of the wells were removed and washed 3 times with saline solution. The adhered biofilm was fixed for 1 hour at 60 °C, and then stained with 200 µL of crystal violet (40%) for 15 minutes at room temperature. After washing, the remaining crystal violet was solubilized with 99% ethanol for 30 minutes, and the absorbance was measured at 570 nm. All assays were performed in quadruplicate, with experiments performed in triplicate.

## 2.4 Bacterial identification

The most promising isolates were identified by sequencing the 16S *rRNA* gene. The gene was amplified by PCR using universal primers 27F, 945F, 1087R and 1492R. The sequences obtained by aligning the amplicons were compared with the sequences available in the database of the Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) and Ribosomal Database Project - MSU (RDP-II).

## 2.5 Genome sequencing and analysis of *Bacillus mobilis*

Genomic DNA was obtained using the Qiagen DNAeasy Plant kit®. Samples were prepared following the Illumina protocol, and whole-genome shotgun sequencing was conducted using the Illumina MiSeq platform. Raw fastq sequences were filtered using Scythe v0.994 and compared to the NCBI RefSeq genome database using RefSeq Masher v0.1.2.

De novo assembly was performed using the Unicycler pipeline (WICK et al., 2017), and genomic annotations were performed using Prokka (SEEMANN et al., 2014) and rapid annotations using Subsystems Technology (RAST) (AZIS et al., 2008). For secondary metabolic analysis, the antiSMASH server (BLIN et al., 2021) was employed. Phylogeny reconstruction was performed by evaluating highly similar sequences, which were retrieved from the NCBI (GenBank), from the 16S *rRNA* gene obtained from the bacterial genome and subjected to multiple sequence alignment using MAFFT (KATOHI & STANDLEY, 2013).

TRimm-AI (CAPELLA et al., 2009) was used to eliminate misaligned positions and divergent regions in the aligned sequences. Subsequently, a Neighbor-Joining phylogenetic tree was constructed using the two-parameter Kimura model for nucleotide substitution and 1000 bootstrap replicates. All phylogenetic analysis was performed using the NGPhylogeny.fr server (LEMOINE et al., 2019).

## 2.6 In vivo toxicity test on *Galleria mellonella* larvae

For the toxicity assay, groups of ten late-instar larvae of *G. mellonella* weighing 220–260 mg were used. Each larva was injected with 10µL of a 100 mg/kg solution using a 10µL syringe with a fixed needle (Hamilton 701N-80300). For the

test, the larvae were injected into the last right proleg with bacterial extracts, which showed antibiofilm activity, diluted in sterile ultrapure water. The following were included as controls: larvae inoculated with DMSO vehicle (positive control), larvae inoculated with vehicle (sterile water and 2% DMSO) (negative control). Each group of 10 larvae was incubated in sterile petri dishes at 37°C for up to 5 days and evaluated daily for survival. Larvae were classified as dead when they were not motile and did not respond to touch. The experiments were repeated three times using 10 larvae per group.

## 2.7 Statistical analysis

The results presented in this study correspond to the average of triplicates. Statistically significant differences were reported when the results showed a probability of occurrence of the null hypothesis lower than 5% ( $p < 0.05$ ) applying analysis of variance (ANOVA), followed by multiple comparisons by Dunnett's test. Analyses were performed using GraphPad Prism version 8.0.

## 3. RESULTS AND DISCUSSION

### 3.1 Screening of antibiofilm formation and antimicrobial activity



of bacteria associated with carnivorous plants

Arora and Srinivasan

Antibiotic activity

[Redacted text block containing the main body of the article]





indicate infections with endobiofilm activity ( $p < 0.05$ ). ANOVA, followed by Dunnett Test vs. all variables.











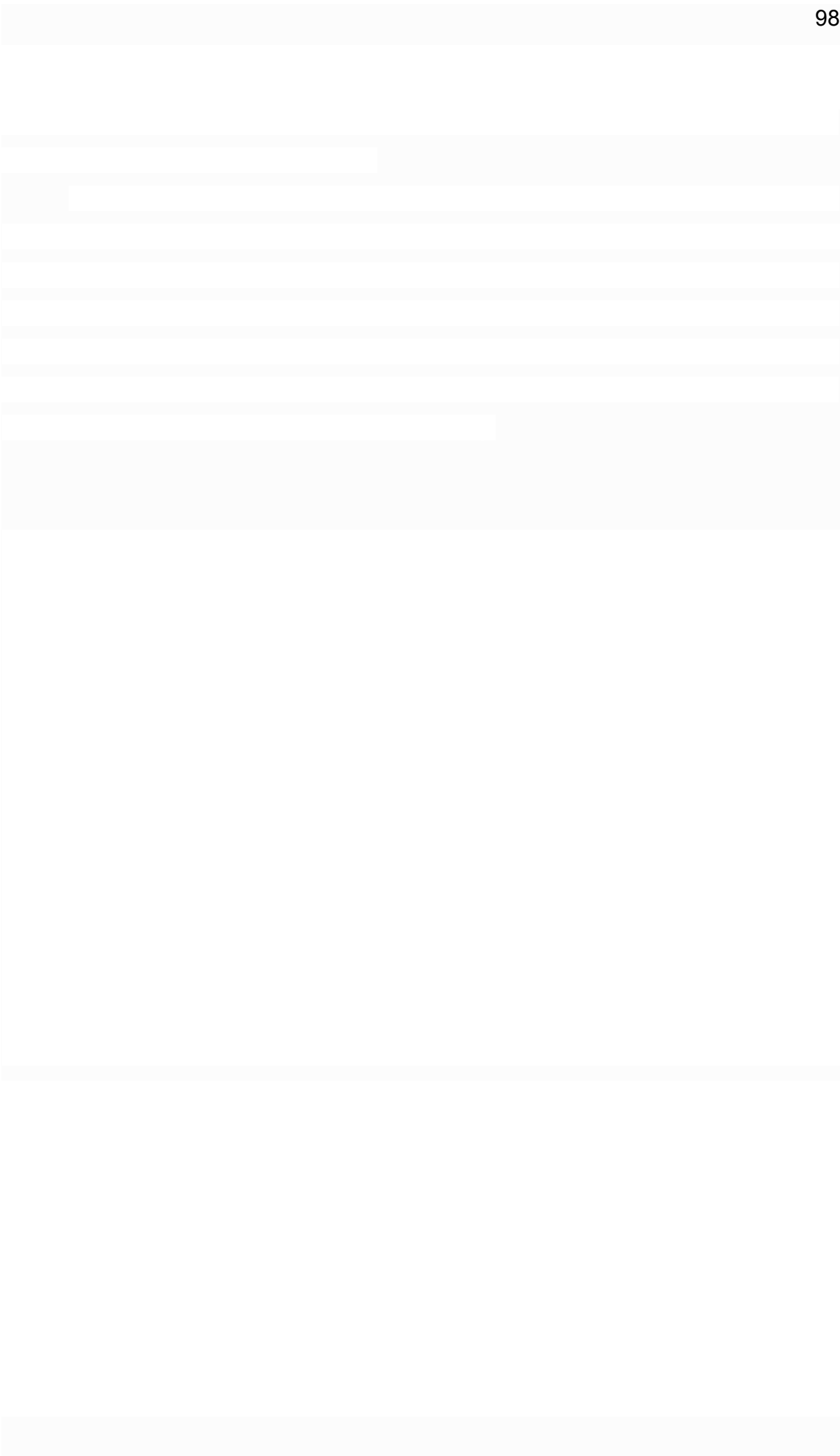
[Redacted text block]

[Redacted text block]





[Redacted text block]











[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]







#### **4. DISCUSSÃO GERAL**



Neste trabalho, a atenção foi focada em moléculas antibiofilme produzidas por bactérias adaptadas ao frio e associadas simbioticamente a plantas, uma vez que representam um reservatório de biodiversidade e uma fonte pouco explorada com potencial de moléculas capazes de inibir a formação de biofilmes patogênicos (*P. aeruginosa* e *S. aureus*).

O biofilme é um fator importante nos processos infecciosos de *S. aureus* e *P. aeruginosa*, mas a composição da matriz e as moléculas envolvidas nas fases de fixação, maturação e desprendimento, nessas duas espécies bacterianas são bem distintos (JOO & OTTO, 2012). A cepa de *Staphylococcus* utilizada neste trabalho foi escolhida com base em diferentes características. Em particular, *S. aureus* ATCC 6538 é uma cepa de referência para testes antimicrobianos, assim como, para *P. aeruginosa* usamos a cepa de referência ATCC 27853, a qual também é um isolado padrão comum usado em testes de suscetibilidade e controle de qualidade.

As diferenças relatadas, em estudos anteriores, nas características de formação do biofilme, dos dois patógenos, como a presença de distintos polissacarídeos, proteínas, lipídios e endotoxinas (em especial as Gram-negativas) podem explicar a divergência na capacidade dos extratos em prevenir a formação do biofilme (AL-WRAFY et al., 2017; PAHARIK & HORSWILL, 2016; SEDARAT & ROBINSON, 2022). É interessante frisar que foram consideradas todas as frações ativas, cujos extratos se mostraram não biocidas e com atividade contra a formação do biofilme.

O aumento da formação de biofilme após o tratamento com alguns extratos fracionados é um resultado intrigante. Isso mantém a ideia da produção de substâncias bacterianas capazes de regular a formação de biofilmes inter e intra espécies, em diferentes nichos ambientais. A identificação dessas moléculas responsáveis por esses mecanismos, pode ser interessante e também abrir novas perspectivas para o controle da formação do biofilme bacteriano.

A investigação de novos habitats e ambientes incomuns, se tornou uma fonte importante para a descoberta de novos metabólitos bacterianos com atividade antimicrobiana. Os extratos mais ativos foram fracionados e as frações resultantes foram testadas para avaliar a atividade contra formação. A avaliação dos extratos das cepas mais promissoras revelou que a diferente composição química das frações associada às diferentes características das duas espécies patogênicas testadas, poderiam explicar os resultados relatados.

O fracionamento dos extratos obtidos das cepas de diferentes ambientes, BCP-320 e N52R1, revelou que as frações obtidas foram capazes de afetar a formação do biofilme de *S. aureus*. A atenção estava voltada para o extrato de *B. siamensis* N52R1, desde que esta amostra afetou de forma eficiente a formação de biofilme contra *P. aeruginosa*. Esse foco está relacionado com a complexidade deste patógeno em responder aos antimicrobianos, atualmente, disponíveis para terapia. Além disso, a dificuldade de encontrar novas moléculas com atividade antimicrobiana contra *P. aeruginosa*, aumentou nosso interesse por esta cepa da Antártica.

A análise por MS revelou a presença de lipopeptídeos (LP) como surfactina, pumilacidina e plipastatina em *B. siamensis* N52R1. Enquanto a análise genômica detectou os compostos fengicina, bacillibactina, paeninodina, marthiapeptideo A e petrobactina em *B. mobilis* BCP-320. Esses achados estão de acordo com as substâncias obtidas para outras espécies do gênero *Bacillus*, isoladas de diversos ambientes.

São poucos os relatos de lipopeptídeos isolados de bactérias adaptadas ao frio. *Pseudomonas fluorescens* BD5, uma bactéria isolada do arquipélago de Svalbard, produz um lipopeptídeo cíclico denominado pseudofactina. Essa substância apresenta boa atividade emulsificante e com atividade antiadesiva contra diversos microrganismos patogênicos (*E. coli*, *E. faecalis*, *E. hirae*, *S. epidermidis*, *P. mirabilis* e *C. albicans*). Outra bactéria adaptada ao frio, capaz de sintetizar lipopeptídeos é a espécie *B. amyloliquefaciens* Pc3 isolada de água marinha da Antártida (DING et al., 2018; JANEK et al., 2012; JEMIL et al., 2017).

Embora na literatura existam raras publicações sobre lipopeptídeos de bactérias polares, diversos relatos descrevem o potencial dessas moléculas em eliminar bactérias patogênicas. Surpreendentemente, muitos lipopeptídeos são ativos contra *S. aureus* como a daptomicina, um lipopeptídeo cíclico que foi aprovado como antibiótico pelo FDA dos EUA, em 2003, para o tratamento de infecções de pele complicada; e a brevibacilina, um lipopeptídeo produzido por uma cepa de *Brevibacillus laterosporus* exibindo atividade antimicrobiana contra *S. aureus* (BALTZ, 2007; YANG et al., 2016).

Os microrganismos associados à plantas são conhecidos pela capacidade de sintetizar alguns compostos químicos semelhantes aos encontrados em extratos de plantas medicinais, provavelmente como uma adaptação ao microambiente do

hospedeiro (MARTINEZ et al., 2017). A análise do genoma de *B. mobilis* BCP-320, epífita de *Drosera*, apresentou algumas características genéticas interessantes, fornecendo informações sobre seu potencial químico como produtor de antimicrobianos.

A análise das sequências do gene *16S rRNA* permitiu esclarecer a posição taxonômica dos isolados, BCP-320 e BCP-514, identificados como *B. mobilis* e *B. subtilis* subsp. *subtilis*. A avaliação dos aglomerados gênicos biossintéticos de metabólitos secundários revelou algumas substâncias que podem estar envolvidas na bioatividade detectada em nosso estudo. No genoma de BCP-320 foi identificado um cluster de genes biossintéticos de peptídeos de laço responsável pela produção de paeninodina. Os peptídeos de laço são uma classe de peptídeos sintetizados ribossomalmente e modificados pós-traducionalmente (RiPPs) conhecidos por suas atividades antimicrobianas e antivirais (HEGEMANN, et al., 2015).

Além disso, o genoma de *B. mobilis* BCP-320 contém 3 clusters de peptídeo sintase não ribossômica (fengicina, bacillibactina e marthiapeptideo A), assim como, abriga também um sideróforo (petrobactina). Essas moléculas são descritas por desenvolverem uma forte atividade antifúngica e antimicrobiana capaz de contrastar o crescimento de microrganismos humanos, vegetais e patogênicos (SEMENZATO et al., 2022).

Os compostos identificados podem estar envolvidos na atividade inibidora da formação de biofilme dos dois patógenos oportunistas (*S. aureus* e *P. aeruginosa*). Dessa forma, é importante ressaltar que nos ensaios *in vivo* os resultados demonstraram que a dose testada a 100 mg/kg, referente aos extratos fracionados de N52R1 (hexânico) e BCP-320, atingiram o valor de DL50 somente para uma das frações testadas. Nesse sentido, esses metabólitos detectados não exibiram risco de toxicidade e apresentam grande potencial como agentes antimicrobianos.



## **5. CONCLUSÃO GERAL**





O presente trabalho teve como objetivo buscar compostos ativos contra formação de biofilmes das espécies patogênicas, *S. aureus* e *P. aeruginosa*. Para isso, compostos de microrganismos de diferentes origens foram avaliados. A triagem dos metabólitos produzidos por bactérias isoladas da Antártica e associadas à plantas carnívoras, exibiram ser uma fonte com grande potencial para se detectar moléculas com atividade antif formação de biofilme.

Três cepas apresentaram atividade contra formação de biofilme de *S. aureus*, enquanto apenas uma cepa foi bem sucedida em inibir a formação de biofilme de *P. aeruginosa*. As cepas de BCP-320, BCP-514 e N52R1 foram identificadas por sequenciamento do gene *16S rRNA* como membros do gênero *Bacillus* (*B. mobilis*, *B. subtilis* e *B. siamensis*, respectivamente).

Os extratos brutos das 3 cepas foram fracionados e as frações mais ativas foram encaminhadas para a caracterização desses metabólitos. A espectrometria de massa realizada em *B. siamensis*, assim como, o sequenciamento do genoma de *B. mobilis* sugerem a presença de compostos ativos pequenos como lipopeptídeos, peptídeos e sideróforos.

Além disso, apenas uma fração de *B. siamensis* exibiu toxicidade (DL50) para a concentração de 100 mg/kg, em larvas de *G. mellonella*. Em conclusão, o objetivo geral deste estudo foi alcançado e evidencia a relevância da triagem microrganismos de diferentes ambientes, para a detecção de metabólitos secundários ativos e inibidores da formação de biofilmes patogênicos.

Essas características se tornam promissoras para a utilização destas moléculas combinadas com antibióticos, o que pode ser um próximo passo a ser avaliado. Outras perspectivas interessantes seriam a investigação de atividade contra patógenos clínicos multirresistentes formadores de biofilme, e a proteção contra infecção em modelo de *G. mellonella*.



## **6. REFERÊNCIAS**



AHMAD, T. et al. Antibacterial potential of Juglomycin A isolated from *Streptomyces achromogenes*, an endophyte of *Crocus sativus* Linn. **Journal of Applied Microbiology**, v. 128, n. 5, p.1366-1377, 2020. DOI: 10.1111/jam.14568.

ALLARD, P.-M. et al. Integration of Molecular Networking and In-Silico MS/MS Fragmentation for Natural Products Dereplication. **Analytical Chemistry**, v. 88, n. 6, p. 3317–3323, 2016. DOI: 10.1021/acs.analchem.5b04804.

AL-WRAFY, F. et al. Pathogenic factors of *Pseudomonas aeruginosa* - the role of biofilm in pathogenicity and as a target for phage therapy. **Postepy Higieny Medycyny Doswiadczalnej** (Online), v. 71, n. 0, p. 78-91, 2017. DOI: 10.5604/01.3001.0010.3792.

ARMBRUSTER, C. R.; PARSEK, M. R. New insight into the early stages of biofilm formation. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, v. 115, n. 17, p. 4317-4319, 2018. DOI: 10.1073/pnas.1804084115.

ASENCIO, G. et al. Antibacterial activity of the Antarctic bacterium *Janthinobacterium* sp. SMN 33.6 against multi-resistant Gram-negative bacteria. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 17, n. 1, pág. 1-5, 2014. DOI:10.1016/j.ejbt.2013.12.001.

BALTZ, R. H. Antimicrobials from *Actinomycetes*. **Microbe**, v. 2, p. 125-131, 2007.

BANO, N. et al. Bioprospecting of the novel isolate *Microbacterium proteolyticum* LA2(R) from the rhizosphere of *Rauwolfia serpentina*. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 29, n. 3, p. 1858-1868, 2022. DOI: 10.1016/j.sjbs.2021.10.038.

BANO, N. et al. Antibacterial efficacy of synthesized silver nanoparticles of *Microbacterium proteolyticum* LA2(R) and *Streptomyces rochei* LA2(O) against biofilm forming meningitis causing microbes. **Scientific Reports**, v. 13, n. 1, p. 4150, 2023. DOI: 10.1038/s41598-023-30215-9.

BARBEY, C. et al. A Rhodococcal Transcriptional Regulatory Mechanism Detects the Common Lactone Ring of AHL *Quórum-Sensing* Signals and Triggers the *Quórum-Quenching* Response. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, n. 2800, 2018. DOI: 10.3389/fmicb.2018.02800.

BHATTACHARYA, M. et al. *Staphylococcus aureus* biofilms release leukocidins to elicit extracellular trap formation and evade neutrophil-mediated killing. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 115, n. 28, p. 7416-7421, 2018. DOI: 10.1073/pnas.1721949115.

BEAUDOIN, C. M. et al. *Staphylococcus aureus* interaction with *Pseudomonas aeruginosa* biofilm enhances tobramycin resistance. **NPJ Biofilms and Microbiomes**, v. 3, n.251, 2017. DOI: 10.1038/s41522-017-0035-0.

BIBI, F. et al. Assessing the diversity of bacterial communities from marine sponges and their bioactive compounds. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 28, n. 5, p. 2747-2754, 2021. DOI: 10.1016/j.sjbs.2021.03.042.

BILLINGS, N. et al. Material properties of biofilms-a review of methods for understanding permeability and mechanics. **Reports on Progress in Physics**, v. 78, n. 3, p. 036601, 2015. DOI: 10.1088/0034-4885/78/3/036601.

BLIN, K. et al. antiSMASH 6.0: improving cluster detection and comparison capabilities. **Nucleic Acids Research**, v. 49, n. W1, p. W29-W35, 2021. DOI: 10.1093/nar/gkab335.

BRAUNER, A. et al. Distinguishing between resistance, tolerance and persistence to antibiotic treatment. **Nature Reviews Microbiology**, v. 14, n. 5, p. 320-330, 2016. DOI: 10.1038/nrmicro.2016.34.

CAMPOCCIA, D. et al. Hijacking of immune defenses by biofilms: a multifront strategy. **Biofouling**, v. 1, n. 20, 2019. DOI: 10.1080/08927014.2019.1689964.

CASTIBLANCO, L. F.; SUNDIN, G. W. New insights on molecular regulation of biofilm formation in plant-associated bacteria. **Journal of Integrative Plant Biology**, n. 58, n. 4, p. 362–372, 2016. DOI: 10.1111/jipb.12428.

CAULIER, S. et al. Overview of the Antimicrobial Compounds Produced by Members of the *Bacillus subtilis* Group. **Frontiers Microbiology**, v. 10, n. 302, 2019. DOI: 10.3389/fmicb.2019.00302.

CLEMENTS, T. et al. Broad-spectrum antimicrobial activity of secondary metabolites produced by *Serratia marcescens* strains. **Microbiological Research**, v. 229, n. 126329, 2019. DOI: 10.1016/j.micres.2019.126329.

CONRADO, R. et al. Overview of Bioactive Fungal Secondary Metabolites: Cytotoxic and Antimicrobial Compounds. **Antibiotics (Basel)**, v. 11, n. 11, p. 1604, 2022. DOI: 10.3390/antibiotics11111604.

COENYE, T. et al. Should standardized susceptibility testing for microbial biofilms be introduced in clinical practice? **Clinical Microbiology and Infection**, v. 24, n. 6, p. 570-572, 2018. DOI:10.1016/j.cmi.2018.01.003.

COSTERTON, J. W. et al. Microbial biofilms. **Annual Review of Microbiology**, v. 49, p. 711-745, 1995. DOI: 10.1146/annurev.mi.49.100195.003431.

COSTERTON, J. W. et al. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. **Science**, v. 284, n. 5418, p. 1318–1322, 1999. DOI: 10.1126/science.284.5418.1318.

COSTERTON, J. W. et al. Biofilm in implant infections: its production and regulation. **International Journal of Artificial Organs**, v. 28, n. 11, p. 1062–1068, 2005. DOI: 10.1177/039139880502801103.

DANILOVICH, M. E. et al. Antarctic bioprospecting: in pursuit of microorganisms producing new antimicrobials and enzymes. **Springer Polar Biology**, v. 41, n. 7, p.1417-1433, 2018. DOI: 10.1007/s00300-018-2295-4.

DANQUAH, C. A. et al. Antimicrobial Compounds from Microorganisms. **Antibiotics (Basel)**, v. 11, n. 3, p. 285-305, 2022. DOI: 10.3390/antibiotics11030285.

DARSHAN, N.; MANONMANI, H. K. Prodigiosin and its potential applications. **Journal of Food Science and Technology**, v. 52, n. 9, p. 5393-5407, 2015. DOI: 10.1007/s13197-015-1740-4.

DENG, Q. et al. Antimicrobial peptide AMPNT-6 from *Bacillus subtilis* inhibits biofilm formation by *Shewanella putrefaciens* and disrupts its preformed biofilms on both abiotic and shrimp shell surfaces. **Food Research International**, v.102, p. 8-13, 2017. DOI: 10.1016/j.foodres.2017.09.057.

DING, Z. et al. Research progress of polar microorganisms secondary metabolites and their bioactivities. **Chinese Journal of Antibiotics**, v. 9, n. 1, p. 6-13, 2014. [https://www.researchgate.net/publication/289716030\\_Research\\_progress\\_of\\_polar\\_microorganisms\\_secondary\\_metabolites\\_and\\_their\\_bioactivities](https://www.researchgate.net/publication/289716030_Research_progress_of_polar_microorganisms_secondary_metabolites_and_their_bioactivities).

DING, L. et al. Exogenous Indole Regulates Lipopeptide Biosynthesis in Antarctic *Bacillus amyloliquefaciens* Pc3. **Journal Microbiology Biotechnology**, v. 28, n. 5, p. 784-795, 2018. DOI: 10.4014/jmb.1712.12014.

DOGHRI, I. et al. Anti-Biofilm Activity of a Low Weight Proteinaceous Molecule from the Marine Bacterium *Pseudoalteromonas* sp. IIIA004 against Marine Bacteria and Human Pathogen Biofilms. **Microorganisms**, v. 8, n. 9, p. 1295, 2020. DOI: 10.3390/microorganisms8091295.

EREGA, A. et al. Bacillaene Mediates the Inhibitory Effect of *Bacillus subtilis* on *Campylobacter jejuni* Biofilms. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 87, n. 12, p.e02955-20, 2021. DOI: 10.1128/AEM.02955-20.

EREGA, A. et al. Impact of *Bacillus subtilis* Antibiotic Bacilysin and *Campylobacter jejuni* Efflux Pumps on Pathogen Survival in Mixed Biofilms. **Microbiology Spectrum**, v. 10, n. 4, p. e02156-22, 2022. DOI: 10.1128/spectrum.02156-22.

FLEMMING, H. C.; WINGENDER, J. The biofilm matrix. **Nature Reviews Microbiology**, v. 8, n. 9, p. 623-33, 2010. DOI: 10.1038/nrmicro2415.

GARRETT, T. R. et al. Bacterial adhesion and biofilms on surfaces, progress in natural science. **Progress in Natural Science**, v. 18, n. 9, p. 1049-1056, 2008. DOI: 10.1016/j.pnsc.2008.04.001.

GIUDICE, A. L.; FANI, R. Antimicrobial potential of cold-adapted bacteria and fungi from polar regions. In: Biotechnology of Extremophiles. **Springer, Grand Challenges in Biology and Biotechnology**, v.1, p. 83-115, 2016. DOI: 10.1007/978-3-319-13521-2\_3.

GIUGLIANO, R. et al. Antiviral Activity of the Rhamnolipids Mixture from the Antarctic Bacterium *Pseudomonas gessardii* M15 against Herpes Simplex Viruses and Coronaviruses. **Pharmaceutics**, v. 13, n. 12, p. 2121, 2021. DOI: 10.3390/pharmaceutics13122121.



GOLINSKI, P. et al. Endophytic actinobacteria of medicinal plants: diversity and bioactivity. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v. 108, n. 2, p.267-289, 2015. DOI: 10.1007/s10482-015-0502-7.

GUO, W. et al. Complete genome of *Bacillus* sp. Pc3 isolated from the Antarctic seawater with antimicrobial activity. **Marine Genomics**, v. 20, p. 1-2, 2015. DOI: 10.1016/j.margen.2015.01.004.

GUPTA, P. et al. Biofilm, pathogenesis and prevention--a journey to break the wall: a review. **Archives of Microbiology**, v. 198, n. 1, p. 01-15, 2016. DOI: 10.1007/s00203-015-1148-6.

HA, D. G.; O'TOOLE, G. A. c-di-GMP and its Effects on Biofilm Formation and Dispersion: a *Pseudomonas Aeruginosa* Review. **Microbiology Spectrum**, v. 3, n. 2, p. MB-0003-2014, 2015. DOI: 10.1128/microbiolspec.MB-0003-2014.

HASAN, F. et al. Production of antibacterial compounds by free and immobilized *Bacillus pumilus* SAF1. **Pakistan Journal Botany**, v. 41, n. 3, p. 1499-1510, 2009. Disponível em: <[http://www.pakbs.org/pjbot/PDFs/41\(3\)/PJB41\(3\)1499.pdf](http://www.pakbs.org/pjbot/PDFs/41(3)/PJB41(3)1499.pdf)>.

HEGEMANN, J. D. et al. Lasso peptides: an intriguing class of bacterial natural products. **Accounts of Chemical Research**, v. 48, n. 7, p. 1909-1919, 2015. DOI: 10.1021/acs.accounts.5b00156.

HUTCHINGS, M. I. et al. Antibiotics: past, present and future. **Current Opinion Microbiology**, v. 51, p. 51-72, 2019. DOI: 10.1016/j.mib.2019.10.008.

ISMAIL, A. et al. Antimicrobial Activities of Bacteria Associated with the Brown Alga *Padina pavonica*. **Frontiers Microbiology**, v. 12, n. 7, p. 1072, 2016. DOI: 10.3389/fmicb.2016.01072.

ISMAIL-BEN ALI, A. et al. *Jania rubens*-associated bacteria: molecular identification and antimicrobial activity. **Journal of Applied Phycology**, v. 24, n. 3, p. 525-534, 2012. DOI: 10.1007/s10811-011-9758-0.

JAMAL, M. et al. Bacterial biofilm and associated infections. **Journal of the Chinese Medical Association**, v. 81 n. 1, p. 07-11, 2018. DOI: 10.1016/j.jcma.2017.07.012.

JANEK, T. et al. Antiadhesive activity of the biosurfactant pseudofactin II secreted by the Arctic bacterium *Pseudomonas fluorescens* BD5. **BMC Microbiology**, v. 12, p. 24, 2012. DOI: 10.1186/1471-2180-12-24.

JEMIL, N. et al. Structural characterization and identification of cyclic lipopeptides produced by *Bacillus methylotrophicus* DCS1 strain. **Journal Chromatography. B Analytical Technologies Biomedical Life Sciences**, v. 1060, p. 374-386, 2017. DOI: 10.1016/j.jchromb.2017.06.013.

JOO, H. S.; OTTO, M. Molecular basis of in vivo biofilm formation by bacterial pathogens. **Chemistry & Biology**, v. 19, n. 12, p. 1503-1513, 2012. DOI: 10.1016/j.chembiol.2012.10.022.

KALPANA, B. J. et al. Antibiofilm Activity of  $\alpha$ -Amylase from *Bacillus subtilis* S8-18 Against Biofilm Forming Human Bacterial Pathogens. **Applied Biochemistry Biotechnology**, v. 167, p. 1778–1794, 2012. DOI:10.1007/s12010-011-9526-2.

KATZ, L.; BALTZ, R. H. Natural product discovery: past, present, and future. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 43, n. 2-3, p. 155-176, 2016. DOI: 10.1007/s10295-015-1723-5.

KARBALAEI, H. R. H. et al, Evaluation of the Bioactive Potential of Secondary Metabolites Produced by a New Marine *Micrococcus* Species Isolated from the Persian Gulf. **Avicenna Journal of Medical Biotechnology**, v. 12, n. 1, p. 61-65, 2020. PMID: PMC7035459.

KEMUNG, H. M. et al. *Streptomyces* sp. Strain MUSC 125 from Mangrove Soil in Malaysia with Anti-MRSA, Anti-Biofilm and Antioxidant Activities. **Molecules**, v. 25, n. 15, p. 3545, 2020. DOI: 10.3390/molecules25153545.

KOVACH, K. et al. Evolutionary adaptations of biofilms infecting cystic fibrosis lungs promote mechanical toughness by adjusting polysaccharide production. **NPJ Biofilms Microbiomes**, v. 3, n.1, 2017. DOI: 10.1038/s41522-016-0007-9.

LAWS, M. et al. Antibiotic resistance breakers: current approaches and future directions. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 43, n. 5, p. 490-516, 2019. DOI: 10.1093/femsre/fuz014.

LEYTON, A. et al . Inhibitory activity of Antarctic bacteria *Pseudomonas* sp. M19B on the biofilm formation of *Flavobacterium psychrophilum* 19749. **Revista de biología marina y oceanografía**, v. 50, n. 2, p. 375-381, 2015. DOI: 10.4067/S0718-19572015000300016.

LIMA, F. R. et al. Cultivated bacterial diversity associated with the carnivorous plant *Utricularia breviscapa* (Lentibulariaceae) from floodplains in Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 49, n. 4, p. 714-722, 2018. DOI: 10.1016/j.bjm.2017.12.013.

LIU, J. et al. Surfactin effectively inhibits *Staphylococcus aureus* adhesion and biofilm formation on surfaces. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 103, p. 4565–4574, 2019. DOI: 10.1007/s00253-019-09808-w.

LOHSE, M. B. et al. Development and regulation of single- and multi-species *Candida albicans* biofilms. **Nature Reviews Microbiology**, v. 16, n. 1, p. 19-31, 2018. DOI: 10.1038/nrmicro.2017.107.

LOPES, S. P. et al. Quantitative assessment of individual populations within polymicrobial biofilms. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, 2018. DOI: 10.1038/s41598-018-27497-9.

MACEDO, A.J.; ABRAHAM, W.R.Can infections biofilm be controlled by blocking bacterial communication? **Medicinal Chemistry**, v. 5, n. 6, p. 517-528, 2009. DOI: 10.2174/157340609790170515.

MACIÀ, M. D. et al. Antimicrobial susceptibility testing in biofilm-growing bacteria. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 20, n. 10, p. 981–990, 2014. DOI: 10.1111/1469-0691.12651.

MAIDA, I. et al. Antimicrobial activity of *Pseudoalteromonas* strains isolated from the Ross Sea (Antarctica) versus Cystic Fibrosis opportunistic pathogens. **Hydrobiologia**, v. 761, n. 1, p. 443–457, 2015. DOI: 10.1007/s10750-015-2190-8.

MAKUWA, S. C.; SEREPA-DLAMINI, M. H. The Antibacterial Activity of Crude Extracts of Secondary Metabolites from Bacterial Endophytes Associated with *Dicoma anomala*. **International Journal of Microbiology**, v. 2021, n. 8812043, 2021. DOI: 10.1155/2021/8812043.

MARTINEZ, E. K. et al. Endophytes as sources of antibiotics. **Biochemical Pharmacology**, v. 134, p. 1-17, 2017. DOI: 10.1016/j.bcp.2016.10.010.

MICHAEL.; WATURANGI, D. E. Antibiofilm activity from endophyte bacteria, *Vibrio cholerae* strains, and actinomycetes isolates in liquid and solid culture. **BMC Microbiology**, v. 23, n. 1, p. 83, 2023. DOI: 10.1186/s12866-023-02829-6.

MIRZAEI, R. et al. The biofilm-associated bacterial infections unrelated to indwelling devices. **IUBMB Life**, v. 72, p. 1271-1285, 2020. DOI: 10.1002/iub.2266.

MOORMEIER, D. E. et al. Temporal and stochastic control of *Staphylococcus aureus* biofilm development. **mBio**, v. 5, n. 5, p. e01341-14, 2014. DOI: 10.1128/mBio.01341-14.

MORYL, M. et al. Antimicrobial, antiadhesive and antibiofilm potential of lipopeptides synthesised by *Bacillus subtilis*, on uropathogenic bacteria. **Acta Biochimica Polonica**, v. 62, n. 4, p. 725-732, 2015. DOI: 10.18388/abp.2015\_1120.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural Products as Sources of New Drugs over the Nearly Four Decades from 01/1981 to 09/2019. **Journal of Natural Products**, v. 83, n. 3, p. 770-803, 2020. DOI: 10.1021/acs.jnatprod.9b01285.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Plant Endophytes and Epiphytes: Burgeoning Sources of Known and "Unknown" Cytotoxic and Antibiotic Agents? **Planta Medica**, v. 86, n. 13-14, p. 891-905, 2020. DOI: 10.1055/a-1095-1111.

NÚÑEZ-MONTERO, K. BARRIENTOS, L. Advances in Antarctic Research for Antimicrobial Discovery: A Comprehensive Narrative Review of Bacteria from Antarctic Environments as Potential Sources of Novel Antibiotic Compounds Against Human Pathogens and Microorganisms of Industrial Importance. **Antibiotics (Basel)**, v. 7, n. 4, p. 90-113, 2018. DOI: 10.3390/antibiotics7040090.

NÚÑEZ, de la C. F. et al. Bacterial biofilm development as a multicellular adaptation: antibiotic resistance and new therapeutic strategies. **Current Opinion in Microbiology**, v. 16, n. 5, p. 580-589, 2013. DOI: 10.1016/j.mib.2013.06.013.

OJA, T. et al. Effective Antibiofilm Polyketides against *Staphylococcus aureus* from the Pyranonaphthoquinone Biosynthetic Pathways of *Streptomyces* Species. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v. 59, n. 10, p. 6046-6052, 2015. DOI: 10.1128/AAC.00991-15.

PAHARIK, A. E.; HORSWILL, A. R. The *Staphylococcal* Biofilm: Adhesins, Regulation, and Host Response. **Microbiology Spectrum**, v. 4, n. 2, p. 529-566, 2016. DOI: 10.1128/microbiolspec.VMBF-0022-2015.

PARK, S. R. et al. Discovery of cahuitamycins as biofilm inhibitors derived from a convergent biosynthetic pathway. **Nature Communications**, v. 7, p. 10710, 2016. DOI: 10.1038/ncomms10710.

PENESYAN, A.; GILLINGS, M.; PAULSEN, I. T. Antibiotic Discovery: Combatting Bacterial Resistance in Cells and in Biofilm Communities. **Molecules**, v. 20, n. 4, p. 5286-5298, 2015. DOI: 10.3390/molecules20045286.

PFANNENSTIEL, B.T.; KELLER, N. P. On top of biosynthetic gene clusters: How epigenetic machinery influences secondary metabolism in fungi. **Biotechnology Advances**, v. 37, n. 6, p. 107345, 2019. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2019.02.001.

POURNEJATI, R. et al. An Aminoglycoside Antibacterial Substance, S-137-R, Produced by Newly Isolated *Bacillus velezensis* Strain RP137 from the Persian Gulf. **Current Microbiology**, v. 76, n. 9, p. 1028-1037, 2019. DOI: 10.1007/s00284-019-01715-7.

PRASHITH, T. R. K. Isolation, Characterization and Antimicrobial Potential of Endophytic Actinomycetes. **Int. J. of Current Microbiol. and Applied Sciences**, v. 5, n. 7. p.100-116, 2016. DOI:10.20546/ijcmas.2016.507.008.

PRIETO, M. L. et al. Assessment of the bacteriocinogenic potential of marine bacteria reveals lichenicidin production by seaweed-derived *Bacillus* spp. **Marine drugs**, v. 10, n. 10, p. 2280-2299, 2012. DOI: 10.3390/md10102280.

RATHER, I. A. et. al. *Limosilactobacillus fermentum* KAU0021 Abrogates Mono- and Polymicrobial Biofilms Formed by *Candida albicans* and *Staphylococcus aureus*. **Pharmaceutics**, v. 15, n. 4, p. 1079, 2023. DOI: 10.3390/pharmaceutics15041079.

RODRIGUES, J. Z. S. et al. Antimicrobial activity of *Lactobacillus fermentum* TcUESC01 against *Streptococcus mutans* UA159. **Microbial Pathogenesis**, v. 142, n. 104063, 2020. DOI: 10.1016/j.micpath.2020.104063.

ROY, S.; BANERJEE, D. Bioactive endophytic actinomycetes of *Cinnamomum* sp.; isolation, identification, activity guided purification and process optimization of active metabolite. **American Journal of Microbiology**, v. 6, n. 1, p. 4-13, 2015. DOI:10.3844/ajmsp.2015.4.13.

SAEED, K. et al. 2018 international consensus meeting on musculoskeletal infection: Summary from the biofilm workgroup and consensus on biofilm related

musculoskeletal infections. **Journal Orthopaedic Research**, v. 37, n. 5. p. 1007-1017, 2019. DOI: 10.1002/jor.24229.

SANTOS, J. D. et al. Bioactivities and Extract Dereplication of Actinomycetales Isolated From Marine Sponges. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, n. 10, p. 727. DOI: 10.3389/fmicb.2019.00727.

SEDARAT, Z.; TAYLOR, A. W. R. Biofilm Formation by Pathogenic Bacteria: Applying a *Staphylococcus aureus* Model to Appraise Potential Targets for Therapeutic Intervention. **Pathogens**, v. 11, n. 4, p. 388, 2022. DOI: 10.3390/pathogens11040388.

SHARMA, D. et al. Antibiotics versus biofilm: an emerging battleground in microbial communities. **Antimicrobial Resistance and Infection Control**, v. 8, n. 76, 2019. DOI: 10.1186/s13756-019-0533-3.

SINGH, R.; DUBEY, A. K. Isolation and Characterization of a New Endophytic Actinobacterium *Streptomyces californicus* Strain ADR1 as a Promising Source of Anti-Bacterial, Anti-Biofilm and Antioxidant Metabolites. **Microorganisms**, v. 8, n. 6, p. 929, 2020. DOI: 10.3390/microorganisms8060929.

SINGH, M. et al. Endophytic bacteria: a new source of bioactive compounds. **3 Biotech**, v. 7, n. 5, p. 315, 2017. DOI: 10.1007/s13205-017-0942-z.

SINGH, V. K. et al. 3-Benzyl-Hexahydro-Pyrrolo[1,2-a]Pyrazine-1,4-Dione Extracted From *Exiguobacterium indicum* Showed Anti-biofilm Activity Against *Pseudomonas aeruginosa* by Attenuating Quorum Sensing. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, n. 1269, 2019. DOI: 10.3389/fmicb.2019.01269.

SONG, Y. et al. Antibiofilm activity substances derived from coral symbiotic bacterial extract inhibit biofouling by the model strain *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. **Microbial Biotechnology**, v. 11, n. 6, p. 1090-1105, 2018. DOI:10.1111/1751-7915.13312.

STINCONE, P.; BRANDELLI, A. Marine bacteria as source of antimicrobial compounds. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 40, n. 3, p. 306-319, 2020. DOI: 10.1080/07388551.2019.1710457.

SRINIVASAN, R. et al. Marine Bacterial Secondary Metabolites: A Treasure House for Structurally Unique and Effective Antimicrobial Compounds. **Marine Drugs**, v. 19, n. 10, p. 530, 2021. DOI: 10.3390/md19100530.

SUGIMOTO, S. et al. Imaging of bacterial multicellular behaviour in biofilms in liquid by atmospheric scanning electron microscopy. **Scientific Reports**, v. 6, p. 25889, 2016. DOI: 10.1038/srep25889.

SUN, H. et al. Isolation, characterization, and antimicrobial activity of endophytic bacteria from *Polygonum cuspidatum*. **African Journal of Microbiology Research**, v. 7, n. 16, p. 1496-1504, 2013. DOI:10.5897/AJMR12.899.

SUNKAR, S.; NACHIYAR, C. V. Biogenesis of antibacterial silver nanoparticles using the endophytic bacterium *Bacillus cereus* isolated from *Garcinia xanthochymus*. **Asian Pacific Journal Tropical Biomedicine**, v. 2, n. 12, p. 953-959, 2012. DOI: 10.1016/S2221-1691(13)60006-4.

TEILLANT, A. et al. Potential burden of antibiotic resistance on surgery and cancer chemotherapy antibiotic prophylaxis in the USA: a literature review and modelling study. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 15, n. 12, p. 1429-1437, 2015. DOI: 10.1016/S1473-3099(15)00270-4.

THEURETZBACHER, U. Global antibacterial resistance: The never-ending story. **Journal of Global Antimicrobial Resistance**, v. 1, n. 2, p. 63-69, 2013. DOI: 10.1016/j.jgar.2013.03.010.

THIRUMURUGAN, D. et al. An introductory chapter: secondary metabolites [Internet]. **Secondary Metabolites - Sources and Applications**, p. 1-21, 2018. DOI: 10.5772/intechopen.79766.

TOYOFUKU, M. et al. Environmental factors that shape biofilm formation. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v. 80, n. 1, p. 7-12, 2016. DOI: 10.1080/09168451.2015.1058701.

TOMOVA, I. et al. Antimicrobial activity and resistance to heavy metals and antibiotics of heterotrophic bacteria isolated from sediment and soil samples collected from two Antarctic islands. **Frontiers in Life Science**, v. 8, n. 4, p. 348-357, 2015. DOI: 10.1080/21553769.2015.1044130.

TURNER, N. A. et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: an overview of basic and clinical research. **Nature Reviews Microbiology**, v. 17, n. 4, p. 203-218, 2019. DOI: 10.1038/s41579-018-0147-4.

UNDABARRENA, A. et al. Exploring the Diversity and Antimicrobial Potential of Marine Actinobacteria from the Comau Fjord in Northern Patagonia, Chile. **Frontiers Microbiology**, v. 7, n. 1135, 2016. DOI: 10.3389/fmicb.2016.01135.

VENTOLA, C. L. The antibiotic resistance crisis: part 1: causes and threats. **Pharmacy and Therapeutics**, v. 40, n. 4, p. 277-283, 2015. PMID: PMC4378521.

VISNAPUU, A. et al. Deconstructing the Phage-Bacterial Biofilm Interaction as a Basis to Establish New Antibiofilm Strategies. **Viruses**, v. 14, n. 5, p. 1057, 2022. DOI: 10.3390/v14051057.

VORHOLT, J. Microbial life in the phyllosphere. **Nature Reviews Microbiology**, v. 10, p. 828-840, 2012. DOI: 10.1038/nrmicro2910.

WIBOWO, J. T. et al. Secondary Metabolites from Marine-Derived Bacteria with Antibiotic and Antibiofilm Activities against Drug-Resistant Pathogens. **Marine Drugs**, v. 21, n. 1, p. 50, 2023. DOI: 10.3390/md21010050.

WHO. World Health Organization. **Global Action Plan on Antimicrobial Resistance**. 2015. Disponível em: <<http://www.who.int/antimicrobial-resistance/en/>>. Acesso em: 14/04/2023.

WHO/FAO/OIE. World Health Organization; Food and Agriculture Organization of the United Nations; World Organisation for Animal Health. **Antimicrobial resistance: A manual for developing national action plans**. Version 1, 2016. Disponível em: <<https://www.who.int/publications/i/item/antimicrobial-resistance-a-manual-for-developing-national-action-plans>>. Acesso em: 14/04/2023.

WHO. World Health Organization. 2021 **Antibacterial agents in clinical and preclinical development: an overview and analysis**. Geneva: World Health Organization, 2022. Disponível em: <<https://www.who.int/publications/i/item/9789240047655>>. Acesso em: 14/04/2023.

XIE, T. T. et al. Antibiofilm activity of three *Actinomycete* strains against *Staphylococcus epidermidis*. **Applied Microbiology International**, v. 68, n. 1, p. 73-80, 2019. DOI: 10.1111/lam.13087.

YAN, J. et al. Bacterial Biofilm Material Properties Enable Removal and Transfer by Capillary Peeling. **Advanced Materials**, v. 30, n. 46, 2018. DOI: 10.1002/adma.201804153.

YANG, X. et al. Isolation and Structural Elucidation of Brevibacillin, an Antimicrobial Lipopeptide from *Brevibacillus laterosporus* That Combats Drug-Resistant Gram-Positive Bacteria. **Applied Environmental Microbiology**, v. 82, n. 9, p. 2763-2772, 2016. DOI: 10.1128/AEM.00315-16.

ZHANG, J. et al. Maipomycin A, a Novel Natural Compound With Promising Anti-biofilm Activity Against Gram-Negative Pathogenic Bacteria. **Frontiers Microbiology**, v. 11, n. 598024, 2020. DOI: 10.3389/fmicb.2020.598024.

ZHOU, S. et al. Effect of *quorum*-quenching bacterium *Bacillus* sp. QSI-1 on protein profiles and extracellular enzymatic activities of *Aeromonas hydrophila* YJ-1. **BMC Microbiology**, v. 19, n. 1, p. 135, 2019. DOI: 10.1186/s12866-019-1515-6.