



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DE TECNOLOGIA
Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia



**ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DOS ENDOFÍTICOS
Paenibacillus terrae E *P. polymyxa* EM CO-CULTIVO COM
Bacillus thuringiensis E *B. megaterium* E POR ADIÇÃO DE
AgNO₃**

Larissa de Cassia Barbosa

Monografia do Exame de Defesa de Mestrado apresentada ao Programa de Mestrado em Biotecnologia do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal de São Carlos para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Orientador:

Prof^a. Dr^a. Cristina Paiva de Sousa

Bolsista CAPES - 88887.894257/2023-00

**São Carlos -SP
2025**

LARISSA DE CASSIA BARBOSA

Atividade antimicrobiana dos endofíticos *Paenibacillus terrae* e *P. polymyxa* em co-cultivo com *Bacillus thuringiensis* e *B. megaterium* e por adição de AgNO_3

Monografia do Exame de Defesa de Mestrado apresentada ao Programa de Mestrado em Biotecnologia do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal de São Carlos para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Orientador:

Prof^a. Dr^a. Cristina Paiva de Sousa

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Cristina Paiva de Sousa
Departamento de Morfologia e Patologia - UFSCar
Presidente

Prof. Dr. Anderson Ferreira da Cunha
Departamento de Genética e Evolução - UFSCar

Prof. Dr. Adilson César Abreu Bernardi
Universidade de Araraquara - UNIARA

São Carlos
2025

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia
Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia

Folha de aprovação

Defesa de Dissertação de Mestrado da candidata Larissa de Cassia Barbosa, realizada em 02/07/2025.

Comissão Julgadora:

Profª. Dra. Cristina Paiva de Sousa (UFSCar)

Prof. Dr. Anderson Ferreira da Cunha (UFSCar)

Prof. Dr. Adilson Cesar Abreu Bernardi (UNIARA)

"O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001

"This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Finance Code 001"

O Relatório de Defesa assinado pelos membros da Comissão Julgadora encontra-se arquivado junto ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia.

Barbosa, Larissa de Cassia. **Atividade antimicrobiana dos endofíticos *Paenibacillus terrae* e *P. polymyxa* em co-cultivo com *Bacillus thuringiensis* e *B. megaterium* e por adição de AgNO_3** . 2025. Dissertação (Programa de Pós-graduação em Biotecnologia) – UFSCar, São Carlos, 2025.

RESUMO

Os microrganismos endofíticos, isolados de tecidos vegetais, podem proporcionar diversos benefícios para a planta hospedeira, através da produção de metabólitos secundários bioativos. Além da promoção de crescimento vegetal, aumento da resistência da planta a estresses bióticos e abióticos, esses metabólitos secundários possuem aplicações diversas, entre elas antibióticos, inseticidas, antioxidantes naturais, agentes antitumorais, entre outros. Diante desse cenário, buscou-se avaliar o potencial antibacteriano e antifúngico de *Paenibacillus terrae* e *Paenibacillus polymyxa* em comparativo com o co-cultivo. Tanto *P. polymyxa* quanto *P. terrae*, apresentaram maior atividade antimicrobiana quando em co-cultivo com *Bacillus thuringiensis* e *Bacillus megaterium* alcançando halos de inibição de 14, 15 e 15 mm contra *E. coli*, *S. aureus* e *C. albicans*, respectivamente. Ao realizar o teste de microdiluição para a obtenção da Concentração Inibitória Mínima e Concentração Bactericida Mínima foi observada atividade quando não utilizado o processo de filtração. Os melhores co-cultivos obtiveram uma porcentagem de inibição de 89% e CIM de 3000 $\mu\text{g/mL}$ contra *E. coli*, 6000 $\mu\text{g/mL}$ contra *S. aureus*, 1500 $\mu\text{g/mL}$ contra *C. albicans*, enquanto a CBM foi de 6000 $\mu\text{g/mL}$ contra *E. coli* e *S. aureus* e de 1500 $\mu\text{g/mL}$ contra *C. albicans*. Na biossíntese de nanopartículas de prata, o resultado positivo pode ser observado pela mudança de cor observada durante a reação e pelos picos observados na análise de UV-Vis em 412, 431 e 450 nm. O tamanho médio observado para as nanopartículas sintetizadas foi entre 124 e 257 nm na análise de NTA e entre 140 e 566 nm na análise de DLS. A adição de pequenas concentrações de nanopartículas afetou a atividade antimicrobiana do cultivo de *P. polymyxa*, na adição de $8,236 \times 10^8$ partículas/mL no período de fermentação o cultivo os halos de inibição observados foram de 15 mm, 15,33 mm e 14,33 mm contra *E. coli*, *S. aureus* e *C. albicans*, respectivamente, em comparação ao controle que apresentou 11,67 mm, 13 mm e 12,33 mm, também contra *E. coli*, *S. aureus* e *C. albicans*, respectivamente.

Palavras-chave: Microrganismos endofíticos, atividade antimicrobiana, co-cultivo, síntese verde, nanopartículas metálicas

Barbosa, Larissa de Cassia. **Antimicrobial activity of endophytes *Paenibacillus terrae* and *P. polymyxa* in co-culture with *Bacillus thuringiensis* and *B. megaterium* and with AgNO₃**. 2025. Dissertação (Programa de Pós-graduação em Biotecnologia) – UFSCar, São Carlos, 2025.

ABSTRACT

Endophytic microorganisms, isolated from plant tissues, can provide numerous benefits to their host plants through the production of bioactive secondary metabolites. In addition to promoting plant growth and increasing resistance to biotic and abiotic stresses, these secondary metabolites have various applications, including antibiotics, insecticides, natural antioxidants, and antitumor agents. In this context, the present study aimed to evaluate the antibacterial and antifungal potential of *Paenibacillus terrae* and *Paenibacillus polymyxa*, in comparison with their co-cultivation. Both *P. polymyxa* and *P. terrae* exhibited enhanced antimicrobial activity when co-cultivated with *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus megaterium*, achieving inhibition zones of 14, 15 and 15 mm against *E. coli*, *S. aureus*, and *C. albicans*, respectively. The broth microdilution test for determining the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and Minimum Bactericidal Concentration (MBC) revealed antimicrobial activity only in the absence of a filtration step. Under these conditions, the most effective co-cultures reached an inhibition rate of 89%, with MIC values of 3000 µg/mL against *E. coli*, 6000 µg/mL against *S. aureus*, and 1500 µg/mL against *C. albicans*. The MBC values were 6000 µg/mL against both *E. coli* and *S. aureus*, and 1500 µg/mL against *C. albicans*. In the biosynthesis of silver nanoparticles, a positive reaction was indicated by the color change observed during the process and by characteristic peaks in UV-Vis analysis at 412, 431, and 450 nm. The average size of the synthesized nanoparticles ranged from 124 to 257 nm according to NTA, and from 140 to 566 nm according to DLS. The addition of small concentrations of nanoparticles influenced the antimicrobial activity of *P. polymyxa* cultures. When 8.236×10^8 particles/mL were added during fermentation, the resulting inhibition zones were 15 mm, 15.33 mm, and 14.33 mm against *E. coli*, *S. aureus*, and *C. albicans*, respectively. These values were higher than those observed in the control, which presented inhibition zones of 11.67 mm, 13 mm, and 12.33 mm, respectively, against the same microorganisms.

Keywords: Endophytic microorganisms, antimicrobial activity, co-culture, green synthesis, metallic nanoparticles.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Associação da taxa de mortalidade a patógenos resistentes..... 15
- Figura 2:** Esquema da montagem dos co-cultivos, com base no volume inicial de inóculo..... 25
- Figura 3:** Esquema ilustrativo da análise da atividade antimicrobiana pelo método de difusão em ágar. 26
- Figura 4:** Layout utilizado para a análise de concentração inibitória mínima dos cultivos microbianos.. 27
- Figura 5:** Layout utilizado para a análise de concentração inibitória mínima das nanopartículas..... 28
- Figura 6:** Esquema ilustrativo da análise da atividade antimicrobiana pelo método de microdiluição, para obtenção da concentração inibitória mínima e concentração bactericida mínima (CIM e CBM)..29
- Figura 7:** Esquema ilustrativo da biossíntese de nanopartículas de prata a partir dos cultivos microbianos.....30
- Figura 8:** Esquema ilustrativo dos métodos utilizados para a caracterização das nanopartículas de prata.....31
- Figura 9:** Esquema ilustrativo da análise da intervenção das nanopartículas nos cultivos simples e co-cultivos em função da atividade antimicrobiana observada, realizada pelo método de difusão em ágar..... 32
- Figura 10:** Halos de inibição indicando atividade antimicrobiana dos co-cultivos C3, C4, C5, C6, C7 e C8 contra a bactéria *E.coli*, variando pelo tempo de cultivo. A = 24h; B = 48h; C = 72h; D = 96h; E = 120h; F = 144h e G = 168h..... 34
- Figura 11:** Gráficos da variação do diâmetro de halo de cada cultivo testado pelo tempo (24h -168h), em diferentes proporções iniciais de inóculo (1:1 e 2:1) com relação aos co-cultivos (C1, C2, C3, C4, C5, C6, C7 e C8). Os gráficos A, B e C, correspondem à proporção 1:1, e os gráficos D, E e F, correspondem à proporção 2:1. A e D = testes realizados contra a bactéria *E. coli*. B e E = testes realizados contra a bactéria *S. aureus*. C e F = testes realizados contra o fungo leveduriforme *C.albicans*..... 36
- Figura 12:** Gráficos da porcentagem de inibição do crescimento microbiano de cada cultivo testado (PP, PT, C1, C2, C3, C4, C5, C6, C7 e C8) contra as bactérias *E.coli*, *S.aureus* e *C.albicans*, em diferentes concentrações com relação aos controles. CE = controle de esterilidade. CC = controle de crescimento..... 38
- Figura 13:** Resultado da concentração mínima inibitória, após a adição de resazurina, para os cultivos C2, C3, C6 e C7 em triplicata, contra as bactérias *E.coli*, *S.aureus* e *C.albicans*. Em azul podemos observar os poços em que houve a inibição microbiana. CE = controle de esterilidade. CC = controle de crescimento microbiano..... 41
- Figura 14:** Gráficos da porcentagem de inibição do crescimento microbiano de cada cultivo testado nas concentrações 6000, 3000, 1500, 750, 370 ($\mu\text{L/mL}$), contra as bactérias *E.coli*, *S.aureus* e *C.albicans*. CE = controle de esterilidade. CC = controle de crescimento.....41
- Figura 15:** Coloração observada para cada solução reacional de nanopartículas de prata. A = Solução reacional antes da síntese. B = Solução reacional a partir do cultivo PP. C = Solução reacional a partir do cultivo PT. D = Solução reacional a partir do cultivo BT. E = Solução reacional a partir do cultivo BM..... 43
- Figura 16:** Gráficos obtidos através da análise por espectrofotometria (UV-Vis) operando entre 200 e 800 nm, demonstrando o pico entre 412 - 450 nm, indicando a presença de nanopartículas de prata para os diferentes cultivos utilizados para a biossíntese. A = Solução reacional a partir do cultivo PP. B

= Solução reacional a partir do cultivo PT. C = Solução reacional a partir do cultivo BT. D = Solução reacional a partir do cultivo BM..... 44

Figura 17: Gráficos obtidos a partir da Análise de Rastreamento de Nanopartículas, em que podemos observar o tamanho das partículas (nm) e sua concentração para cada tamanho encontrado. A = Nanopartículas sintetizadas a partir do cultivo PP. B = Nanopartículas sintetizadas a partir do cultivo PT. C = Nanopartículas sintetizadas a partir do cultivo BT. D = Nanopartículas sintetizadas a partir do cultivo BM..... 46

Figura 18: Gráficos da porcentagem de inibição do crescimento microbiano de cada nanopartícula testada (PP, PT, BT e BM) contra as bactérias *E.coli*, *S.aureus* e *C.albicans*, em diferentes diluições com relação aos controles. CE = controle de esterilidade. CC = controle de crescimento.....48

Figura 19: Resultado da concentração mínima inibitória, após a adição de resazurina, para as soluções reacionais a partir dos cultivos PP, PT, BT e BM em triplicata, contra as bactérias *E.coli*, *S.aureus* e *C.albicans*. Em azul podemos observar os poços em que houve a inibição microbiana. CE = controle de esterilidade. CC = controle de crescimento microbiano. C = AgNO₃.....49

Figura 20: Gráficos da variação do diâmetro de halo para cada concentração de nanopartículas testada em adição aos cultivos PP, C2, C3, C6 e C7, contra os microrganismos *E.coli*, *S.aureus* e *C.albicans*. C= controle de cada cultivo sem adição de nanopartículas..... 50

Figura 21: Gráficos da variação do diâmetro de halo para cada um dos cultivos testados PP, C2, C3, C6 e C7, em adição das concentrações $8,236 \times 10^8$; $1,647 \times 10^8$; $8,236 \times 10^7$, $1,647 \times 10^7$ e $8,236 \times 10^6$ partículas/mL de nanopartículas, testados contra os microrganismos *E.coli*, *S.aureus* e *C.albicans*. C= controle de cada cultivo sem adição de nanopartículas..... 51

Figura 22: Halos de inibição indicando atividade antimicrobiana dos cultivos PP, C2, C3, C6 e C7 em adição das concentrações $8,236 \times 10^8$ (10); $1,647 \times 10^8$ (50); $8,236 \times 10^7$ (100), $1,647 \times 10^7$ (500) e $8,236 \times 10^6$ (1000) partículas/mL de nanopartículas, e o controle sem a adição de nanopartículas, testados contra os microrganismos *E.coli*, *S.aureus* e *C.albicans*. Os valores 10, 50, 100, 500 e 1000, presentes nas placas simbolizam as diluições realizadas para obter as concentrações testadas. A = Cultivo PP testado contra *E.coli*. B = Cultivo PP testado contra *S.aureus*. C = Cultivo PP testado contra *C.albicans*. D = Cultivo C2 testado contra *E.coli*. E = Cultivo C2 testado contra *S.aureus*. F = Cultivo C2 testado contra *C.albicans*. G = Cultivo C3 testado contra *E.coli*. H = Cultivo C3 testado contra *S.aureus*. I = Cultivo C3 testado contra *C.albicans*. J = Cultivo C6 testado contra *E.coli*. K = Cultivo C6 testado contra *S.aureus*. L = Cultivo C6 testado contra *C.albicans*. M = Cultivo C7 testado contra *E.coli*. N = Cultivo C7 testado contra *S.aureus*. O = Cultivo C7 testado contra *C.albicans*..... 52

Figura 23: Ensaios de citotoxicidade em fibroblastos. Metabolismo celular (%) pelo ensaio com MTT. Células HDFn após 24 horas de exposição aos cultivos, co-cultivos e nanopartículas PP, C2, C3, C6, C7, PP(N), PT(N), BT(N), BM(N) e PP(10) e suas diluições. (*) vs C-; * p ≤ 0,05; ** p ≤ 0,01; *** p ≤ 0,001; **** p ≤ 0,0001..... 53

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Características gerais dos microrganismos <i>Paenibacillus terrae</i> e <i>Paenibacillus polymyxa</i> .	18
Tabela 2. Características gerais dos microrganismos <i>Bacillus megaterium</i> e <i>Bacillus thuringiensis</i>	19
Tabela 3. Maior diâmetro de halo (mm) com relação ao melhor tempo de incubação para cada co-cultivo.....	34
Tabela 4. Concentração Inibitória Mínima e porcentagem de inibição dos co-cultivos com atividade antimicrobiana significativa.....	40
Tabela 5. Tamanho (nm) e concentração (partículas/mL) de nanopartículas presentes em cada solução reacional. Para a praticidade de identificação, cada solução reacional foi identificada com o nome do cultivo utilizado para a biossíntese.....	46
Tabela 6. Tamanho (nm), PDI e potencial Zeta (mV) das nanopartículas em meio líquido. Para a praticidade de identificação, cada solução reacional foi identificada com o nome do cultivo utilizado para a biossíntese.....	47
Tabela 7. Concentração Inibitória Mínima e porcentagem de inibição das AgNPs.....	49

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

YPM Yeast Peptone Mannitol medium

ISP-2 International Streptomyces Project Medium (number 2)

TSB Tryptic Soy Broth

MH Mueller-Hinton

DHalo Diâmetro do Halo

AgNO₃ Nitrato de prata

AgNPs Nanopartículas de prata

UV-Vis Ultravioleta-Visível

NTA Nanoparticle tracking analysis

DLS Dispersão Dinâmica de Luz

PDI Índice de polidispersão

CIM Concentração inibitória mínima

CBM Concentração bactericida mínima

PP *Paenibacillus polymyxa*

PT *Paenibacillus terrae*

BT *Bacillus thuringiensis*

BM *Bacillus megaterium*

C1 Co-cultivo 1 (*Paenibacillus polymyxa* e *Paenibacillus terrae*)

C2 Co-cultivo 2 (*Paenibacillus polymyxa* e *Bacillus thuringiensis*)

C3 Co-cultivo 3 (*Paenibacillus polymyxa* e *Bacillus megaterium*)

C4 Co-cultivo 4 (*Paenibacillus terrae* e *Bacillus thuringiensis*)

C5 Co-cultivo 5 (*Paenibacillus terrae* e *Bacillus megaterium*)

C6 Co-cultivo 6 (*Paenibacillus polymyxa*, *Paenibacillus terrae* e *Bacillus thuringiensis*)

C7 Co-cultivo 7 (*Paenibacillus polymyxa*, *Paenibacillus terrae* e *Bacillus megaterium*)

C8 Co-cultivo 8 (*Paenibacillus polymyxa*, *Paenibacillus terrae*, *Bacillus thuringiensis* e *Bacillus megaterium*)

SUMÁRIO

RESUMO.....	4
ABSTRACT.....	5
LISTA DE FIGURAS.....	6
LISTA DE TABELAS.....	8
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	9
Capítulo 1 – Introdução.....	11
1.1 – Objetivos.....	12
1.2 – Revisão Bibliográfica.....	13
1.2.1 Controle de Infecções e atividade antimicrobiana.....	13
1.2.2 Produtos naturais, metabólitos secundários e microrganismos endofíticos.....	15
1.2.3 Espécies estudadas.....	17
1.2.4 Co-cultivo na produção de metabólitos secundários.....	19
1.2.5 Biossíntese de nanopartículas de prata (AgNPs) e a atividade antimicrobiana.....	20
1.2.5.1 Nanopartículas como indutores abióticos.....	21
Capítulo 2 – Materiais e Métodos.....	22
2.1 Materiais.....	22
2.1.1 Materiais biológicos.....	22
2.2 Preparo dos inóculos bacterianos.....	22
2.3 Padronização dos inóculos.....	23
2.4 Avaliação da bioatividade.....	23
2.4.1 Preparo dos cultivos simples.....	23
2.4.2 Preparo dos cultivos mistos para obtenção da fermentação.....	23
2.4.3 Preparo dos caldos fermentados.....	25
2.4.4 Avaliação da atividade antimicrobiana pela metodologia de difusão em ágar por poço.....	25
2.4.5 Avaliação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM)	26
2.4.5.1 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM).....	26
2.4.5.2 Determinação da Concentração Bactericida Mínima (CBM).....	29
2.5 Biossíntese de AgNPs.....	29
2.6 Caracterização das AgNPs.....	30
2.6.1 Caracterização por espectrofotometria UV-Visível.....	30
2.6.2 Caracterização por Análise de Rastreamento de Nanopartículas (NTA).....	30
2.6.3 Caracterização por Dispersão Dinâmica de Luz (DLS).....	31
2.7 Análise da intervenção das nanopartículas nos cultivos simples e co-cultivos.....	31
2.8 Análise dos efeitos dos caldos fermentados e nanopartículas de prata em linhagem celular humana (in vitro).....	32
2.9 Análise estatística.....	33
Capítulo 3 – Resultados e Discussão.....	33
3.1 Análise da atividade antimicrobiana dos cultivos em variação do tempo.....	33
3.2 Análise de Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM) dos cultivos simples e co-cultivos.....	37
3.3 Análise da biossíntese e caracterização de nanopartículas de prata (AgNPs).....	44

3.4 Análise do estímulo das nanopartículas nos cultivos simples e co-cultivos.....	50
3.5 Análise dos efeitos dos caldos fermentados e nanopartículas de prata em linhagem celular humana (in vitro).....	53
4. Conclusão.....	55
5. Referências Bibliográficas.....	55

Capítulo 1 – Introdução

A indústria farmacêutica e a aplicação de novos agentes bioativos, têm sido de grande importância para o tratamento e controle de infecções, desde muito tempo. No entanto, o aumento da resistência a antibióticos, se tornou uma ameaça global com a maior dificuldade no tratamento de doenças infecciosas, ocasionando assim maior risco de propagação destes patógenos e conseqüentemente um aumento na mortalidade, levando a problemas de saúde pública juntamente com questões econômicas (CORRÊA et al., 2022).

Nesse cenário, a OMS (2017), soltou uma lista de microrganismos com urgência para o desenvolvimento de antibióticos, assim como em urgência para condução de pesquisas associados ao seu risco de propagação e acometimento da população, que ocasionam maior taxa de mortalidade, estando entre eles as bactérias *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* (WHO, 2017). Com isso em mente, a busca por novos compostos antimicrobianos para estes agentes se tornou ainda mais relevante.

Para isso, a bioprospecção de microrganismos endofíticos têm sido cada vez mais utilizada para o desenvolvimento da pesquisa atual (RAIMI; ADELEKE, 2021; OLIVEIRA et al., 2025). Técnicas como o co-cultivo (também conhecido como cultivo misto) têm sido empregadas como estratégia para o aumento da produção de metabólitos secundários por microrganismos, e descoberta de novos metabólitos, se mostrando uma técnica promissora para obtenção desta finalidade (JONES; WANG, 2018; PENG et al., 2021).

Entre as técnicas que têm sido estudadas para o aumento da produção de metabólitos secundários está o estímulo pela adição de pequenas concentrações de metais, como por exemplo, a prata. Uma das maneiras bastante estudadas, é a síntese de nanopartículas utilizando polissacarídeos naturais e caldos fermentados, por serem ecológicos, não tóxicos e não onerosos na preparação, produzindo nanopartículas que apresentam atividade antibacteriana e antifúngica contra patógenos de importância para a saúde pública, como também atividade contra células tumorais (KRISTINA et al., 2023).

Levando estes fatores em consideração, o presente estudo buscou utilizar microrganismos endofíticos *Paenibacillus terrae* e *Paenibacillus polymyxa*, com potenciais antimicrobianos e antifúngicos individuais, em co-cultivo com os microrganismos *Bacillus*

megaterium e *Bacillus thuringiensis* com bioatividades promissoras listadas na literatura, em busca de um aumento na atividade antimicrobiana dos endofíticos utilizados (OLIVEIRA-SANTOS et al., 2023; OLISHEVSKA; NICKZAD; DÉZIEL, 2019; NATARAJAN et al., 2022; MARTÍNEZ-ZAVALA et al., 2020; AL-THUBIANI, 2018; LODI et al., 2023; ROMANO, 2014; CAVICCHIOLI, 2021; SERRANO, 2021; BARBOSA, SOUSA, 2023). Este trabalho buscou explorar ainda a utilização de técnicas combinadas de co-cultivo, biossíntese de nanopartículas de prata, a partir dos caldos fermentados, em associação com íons metálicos, como estimulantes abióticos.

1.1 – Objetivos

Objetivo geral

Empregar a técnica de co-cultivo utilizando *Paenibacillus terrae* e *Paenibacillus polymyxa*, em co-cultivo com *Bacillus thuringiensis* e *Bacillus megaterium* e avaliar a atividade antimicrobiana dos caldos fermentados.

Objetivos específicos

- a) Estudar o potencial antimicrobiano de *Paenibacillus terrae* e *Paenibacillus polymyxa* isolados e em co-cultivo com *Bacillus megaterium* e *Bacillus thuringiensis*, contra *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Candida albicans*.
- b) Avaliar os caldos fermentados de cultivo simples e co-cultivos para determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM).
- c) Detectar o potencial dos caldos fermentados de cultivo simples e co-cultivos em adição a íons de prata (AgNO_3), para a biossíntese de nanopartículas de prata.
- d) Verificar a atividade antimicrobiana dos caldos fermentados de cultivo simples e co-cultivos em adição a diferentes concentrações de nanopartículas de prata.
- e) Inferir os efeitos dos caldos fermentados de cultivo simples, co-cultivos e associados a nanopartículas de prata em linhagem celular humana (in vitro).

1.2 – Revisão Bibliográfica

1.2.1 Controle de Infecções e atividade antimicrobiana

Os produtos naturais possuem uma grande variedade de atividades biológicas, trazendo oportunidades na medicina humana e veterinária, e na agricultura (KATZ; BALTZ, 2016; STIRK; VAN STADEN, 2022) e em Biotecnologia (BOGAS et al., 2024).

A evolução humana foi acompanhada pelo desenvolvimento de medicamentos, com o objetivo de curar enfermidades e aumentar a longevidade. Desde a antiguidade, plantas e a botânica eram empregadas como recursos terapêuticos, e atualmente, por meio de pesquisas e manipulação de componentes naturais e sintéticos, a indústria farmacêutica desenvolve medicamentos a partir de princípios ativos para tratamento e controle de doenças. As plantas ainda são amplamente utilizadas como matéria-prima, juntamente com microrganismos e seus metabólitos secundários (SILVA; ALVIM, 2020).

A indústria farmacêutica tem um papel essencial no tratamento e controle de doenças infecciosas, fazendo o uso de medicamentos e substâncias antimicrobianas, no entanto, a resistência antimicrobiana tem aumentado cada vez mais rápido, se tornando uma ameaça global, e isso acarreta em uma maior dificuldade no tratamento de infecções, ocasionando assim maior risco de propagação de patógenos e conseqüentemente um aumento na mortalidade (CORRÊA et al., 2022).

A Resistência Antimicrobiana (RAM) é um processo natural, que ocorre quando microrganismos não respondem mais aos medicamentos antimicrobianos, por meio de alterações genéticas em patógenos, podendo ser acelerado pela atividade humana pelo uso indevido destes medicamentos antimicrobianos (ANTIMICROBIAL RESISTANCE COLLABORATORS, 2022). A RAM, é um problema global, e apresenta diversos impactos para a sociedade, entre eles o aumento da mortalidade, pela falha no tratamento, como também custos significativos para os sistemas de saúde e economia, com a necessidade de cuidados intensivos mais caros, internações hospitalares prolongadas, afetando a produtividade do paciente e de seus cuidadores (WHO, 2023).

Em meio a essa ameaça global, organizações têm feito o monitoramento do aumento da resistência antimicrobiana, entre elas está o *Global Antimicrobial Resistance and Use Surveillance System* (GLASS) que emitiu um relatório destacando taxas de resistência alarmantes entre patógenos bacterianos prevalentes. Nesse relatório estão presentes taxas medianas relatadas em 76 países de 42% para *Escherichia coli* resistente a cefalosporina de

terceira geração e 35% para *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina. Entre 1 a cada 5 casos de infecções do trato urinário causadas por *E.coli*, foi relatado uma suscetibilidade reduzida a antibióticos padrão como ampicilina, cotrimoxazol e fluoroquinolonas em 2020 (WHO, 2022).

Com o intuito de orientar a pesquisa e desenvolvimento de novos antimicrobianos, a Organização Mundial de Saúde (OMS), liberou uma lista de patógenos bacterianos prioritários em 2017, que sofreu atualização em 2023, e lançou também a lista de patógenos fúngicos em 2022.

A lista de patógenos bacterianos liberada pela OMS contém 12 famílias de bactérias que representam maior ameaça à saúde humana, estando dividida em três categorias: crítica, alta e média prioridade. No grupo crítico incluem-se vários Enterobacteriaceae entre elas *Escherichia coli*, que pode causar infecções graves e está em primeiro lugar dos microrganismos resistentes com maior taxa de mortalidade (figura 1), já no grupo de alta e média prioridade apresentam bactérias cada vez mais resistentes, porém que causam doenças mais comuns, nesses grupos temos como exemplo *Staphylococcus aureus*, resistente à meticilina, intermediária à vancomicina e resistente, como alta prioridade (WHO, 2017), que aparece como o segundo maior responsável pelas altas taxas de mortalidade por microrganismos resistentes (figura 1).

Já a lista de patógenos fúngicos prioritários (OMS FPPL), tem como intuito guiar a pesquisa e desenvolvimento, assim como as ações voltadas para a saúde pública, visando impulsionar mais pesquisas e intervenções políticas e fortalecer a resposta global às infecções fúngicas e à resistência antifúngica. A lista é dividida em três categorias: prioridade crítica, alta e média, estando *Candida albicans* localizado na categoria de prioridade crítica (WHO, 2022).

A RAM também é um problema na veterinária, antibióticos são utilizados na alimentação animal para controlar e prevenir doenças infecciosas, garantindo que os animais estejam saudáveis ao entrarem na cadeia alimentar, porém o uso excessivo desses medicamentos, também leva ao aumento da resistência dos microrganismos combatidos, afetando não somente a saúde do gado, em contrapartida trazendo uma preocupação com a presença de antibióticos em produtos para consumo, de origem animal, como uma via potencial de transmissão para humanos (STIRK; VAN STADEN, 2022).

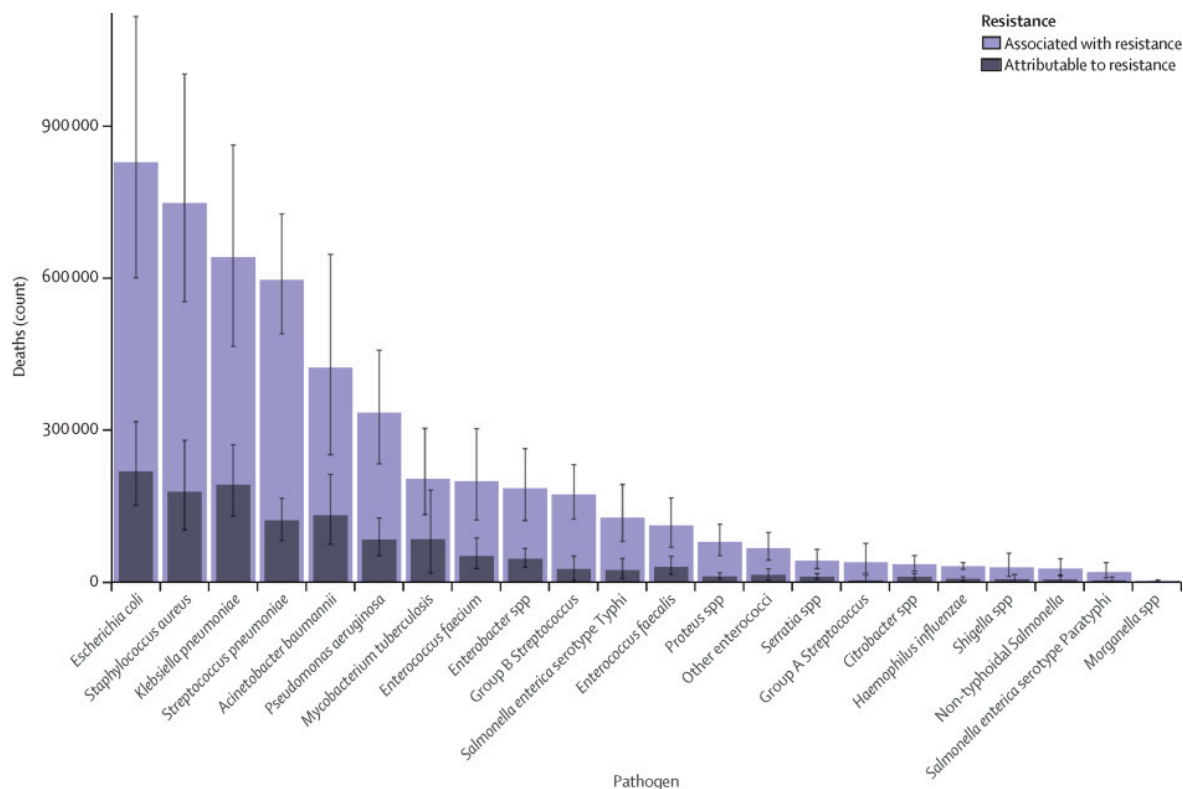


Figura 1: Associação da taxa de mortalidade a patógenos resistentes.

Fonte: ANTIMICROBIAL RESISTANCE COLLABORATORS, 2022

1.2.2 Produtos naturais, metabólitos secundários e microrganismos endofíticos

A busca por novos compostos e metabólitos secundários para novos medicamentos, e aplicações antimicrobianas tem se intensificado, com grande atenção aos produtos naturais (MONIKA et al., 2020; SERRANO et al., 2021).

Os medicamentos derivados de plantas têm sido explorados desde muito tempo, como alternativa a terapias convencionais, mas também a partir da exploração de seus produtos naturais (SANTOS-MIRANDA, 2022).

Atualmente, o poder terapêutico das plantas tem sido reconhecido, devido a diversos estudos demonstrando o potencial biotecnológico das substâncias isoladas, extratos e frações obtidas de diferentes partes das plantas como folhas, flores, frutos, raízes, entre outros, para diferentes aplicações, se destacando em sua aplicação como fitoterápicos e também como uma fonte de compostos bioativos, que podem ser utilizados pela indústria para desenvolver fármacos naturais, semi sintéticos ou sintéticos (DE QUEIROZ; LEITE; VASCONCELOS, 2023; BOGAS et al., 2024).

Diversos pesquisadores têm buscado encontrar novas maneiras de produzir metabólitos a partir de extratos naturais com ações biológicas, em maiores quantidades, porém a produção metabólica das plantas é limitada pelo ambiente e diversas outras variáveis, sendo difícil melhorar seu rendimento em questão de metabólitos produzidos (CARDOSO; OLIVEIRA; CARDOSO, 2019; BOGAS et al., 2024).

Entretanto, esses metabólitos também podem ser encontrados a partir de outras fontes como microrganismos, que diferente das plantas podem ser mais viáveis para uma maior escala, e em alguns casos podem produzir os mesmos metabólitos encontrados nas plantas, como o caso de alguns microrganismos endofíticos (KATZ; BALTZ, 2016; YE et al., 2021).

Os microrganismos endofíticos são aqueles que colonizam o interior dos tecidos de plantas, sem apresentar efeito patogênico aparente à planta hospedeira (CUI et al., 2022).

Diferente de vários fitopatógenos que causam mudanças morfológicas visíveis, os endofíticos não causam mudanças sintomáticas, ou seja, podem estar nos espaços inter e intracelulares de quase todos os órgãos da planta, sem nenhum sintoma evidente. Estes microrganismos podem ser bactérias, fungos, vírus latentes ou patógenos que expressam diferentes atividades simbióticas com a planta hospedeira (DIGRA; NONZOM, 2023).

Os endofíticos apresentam uma grande diversidade e capacidade de sintetizar compostos bioativos comparáveis aos das plantas hospedeiras, despertando um grande interesse aos pesquisadores. Compostos bioativos destes microrganismos, apresentaram potencial terapêutico no tratamento de doenças humanas, como câncer, tumores e doenças bacterianas e fúngicas, evidenciando o potencial do estudo dos endofíticos para necessidades de saúde humana (RAIMI; ADELEKE, 2021; JHA, 2019). Estudos sobre atividades antibacterianas e antifúngicas dos metabólitos produzidos por endofíticos foram relatados (AHMADI, 2022).

Compostos antimicrobianos produzidos por estes microrganismos, são vistos como vantajosos em comparação com os antimicrobianos convencionais, por sua não toxicidade para humanos e eficácia para determinados patógenos nocivos, além de serem menos nocivos ao meio ambiente, reforçando a possibilidade do uso dos metabólitos secundários oriundos dos endofíticos como fontes promissoras de compostos antimicrobianos (DIGRA; NONZOM, 2023).

1.2.3 Espécies estudadas

O gênero *Bacillus* é bastante diverso, a maioria das espécies presentes nesse gênero são Gram-positivas, possuem um formato de colônia arredondado, são formadoras de endósporos, aeróbicas ou anaeróbicas facultativas. Porém tais características não definem completamente o gênero, pois as espécies de *Bacillus* possuem características muito variadas, não apresentando uma característica, fenótipo ou base molecular exclusiva para todas as espécies (PATEL; GUPTA, 2019).

Muitas espécies de *Bacillus* foram reclassificadas em outro gênero, pela heterogeneidade presente no grupo, um desses gêneros é o gênero *Paenibacillus* (PATEL; GUPTA, 2019). Os membros do gênero *Paenibacillus* foram anteriormente incluídos no grupo por características comuns para a espécie *Bacillus subtilis*, isolada em 1872, entretanto com o avanço do sequenciamento de rRNA do 16S, foi possível colocar espécies morfologicamente semelhantes em diferentes grupos, então *Paenibacillus* foi separado em um novo gênero em 1993 (PATOWARY; DEKA, 2020).

As bactérias dos gêneros *Bacillus* e *Paenibacillus* são conhecidas por produzirem policetídeos e lipopeptídeos com forte atividade antimicrobiana de amplo espectro, com ações antibacterianas, antifúngicas, anticancerígenas e antivirais, além de produzirem outros compostos antimicrobianos, como bacteriocinas, que podem atuar contra patógenos agrícolas e humanos (OLISHEVSKA; NICKZAD; DÉZIEL, 2019).

Exemplos dos lipopeptídeos produzidos são polimixinas, surfactinas, fengicinas e iturinas, mesmo sendo conhecidos há décadas, foram redescobertos recentemente como candidatos a antibióticos, e alguns foram aprovados para o tratamento de infecções resistentes a múltiplas drogas, como a daptomicina e a polimixina B (COCHRANE; VEDERAS, 2014; OLISHEVSKA; NICKZAD; DÉZIEL, 2019).

Na literatura podemos encontrar diferentes cepas de *Bacillus thuringiensis* capazes de sintetizar produtos como metabólitos secundários, com diferentes atividades bioativas contra microrganismos (NATARAJAN et al., 2022; MARTÍNEZ-ZAVALA et al., 2020). A δ -endotoxina Cyt1Aa, produzida por uma cepa de *Bacillus thuringiensis*, apresentou atividade antibacteriana contra as bactérias *E.coli* e *S.aureus*, tal atividade foi aumentada quando Cyt1Aa foi combinada com antibióticos (CAHAN; FRIMAN; NITZAN, 2008).

Tal fato evidencia o amplo potencial biotecnológico das cepas de *Bacillus thuringiensis* para diferentes aplicações, como por exemplo a descoberta de novos compostos e sua sinergia com outros antimicrobianos (OLIVEIRA-SANTOS et al., 2023).

Outro exemplo de *Bacillus* sp. com bioatividade comprovada, se mostra pelo estudo de uma cepa de *Bacillus megaterium* isolada de cavidade oral, que foi estudada a fim de observar o seu potencial para a produção de novos compostos antimicrobianos, um novo peptídeo cíclico foi extraído e purificado, e demonstrou uma atividade antimicrobiana de amplo espectro contra bactérias Gram positivas e Gram negativas, como *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* (AL-THUBIANI, 2018).

No caso de *Paenibacillus* sp., podemos encontrar na literatura estudos sobre a sua bioatividade, uma cepa do microrganismo endofítico *Paenibacillus terrae* isolado de *Codonopsis pilosula*, apresentou atividade contra bactérias e fungos, entre eles *E.coli* e *C.albicans* (LODI et al., 2023).

Assim como observado em trabalhos anteriores, em que o caldo fermentado obtido a partir cepas dos endofíticos utilizados no presente trabalho, *Paenibacillus polymyxa* isolada de *Prunus* spp., e *Paenibacillus terrae* isolada de *Tabebuia róseo-alba*, tiveram sua ação comprovada contra cepas potencialmente patogênicas, entre elas *E.coli*, *S.aureus* e *C.albicans* (ROMANO, 2014; CAVICCHIOLI, 2017; SERRANO, 2021; BARBOSA, SOUSA, 2023).

Tabela 1. Características gerais dos microrganismos *Paenibacillus terrae* e *Paenibacillus polymyxa*.

<i>Paenibacillus terrae</i>	<i>Paenibacillus polymyxa</i>
<ul style="list-style-type: none"> ● Isolada de <i>Tabebuia róseo-alba</i> (Ipê) (ROMANO, 2014) ● Gram-positiva, anaeróbia facultativa (SHIN et al., 2012) ● Potencial biotecnológico <ul style="list-style-type: none"> ○ Produtora de xilanase, catalase e CMCase (SHIN et al., 2012; LIANG et al., 2014) ○ Produção de compostos bioativos contra (ROMANO, 2014) <ul style="list-style-type: none"> ■ <i>Staphylococcus aureus</i> ■ <i>Escherichia coli</i> ■ <i>Candida albicans</i> 	<ul style="list-style-type: none"> ● Isolada de <i>Prunus</i> spp. (Pessegueiro do Cerrado) (SERRANO et al., 2021) ● Gram-positiva, anaeróbia facultativa (LANGENDRIES; GOORMACHTIG, 2021) ● Potencial biotecnológico (LANGENDRIES; GOORMACHTIG, 2021) <ul style="list-style-type: none"> ○ Compostos úteis em processos industriais ○ Enzimas <ul style="list-style-type: none"> ■ β-1,3-glucanases, celulasas, quitinases, proteases, xilanases e β-glicosidases ○ Atividade antimicrobiana e anti-inflamatória (SERRANO et al., 2021)

Tabela 2. Características gerais dos microrganismos *Bacillus megaterium* e *Bacillus thuringiensis*.

<i>Bacillus megaterium</i>	<i>Bacillus thuringiensis</i>
<ul style="list-style-type: none"> ● Coleção do Laboratório de Bioquímica e Genética Aplicada (LBGA)-UFSCar ● Gram-positiva, formadora de esporos (VARY, 1994) ● Versatilidade bioquímica (VARY, 2007) <ul style="list-style-type: none"> ○ Toxinas fungicidas ○ Atividade antimicrobiana (AL-THUBIANI, 2018) <ul style="list-style-type: none"> ■ <i>Staphylococcus aureus</i> ■ <i>Escherichia coli</i> 	<ul style="list-style-type: none"> ● Coleção do Laboratório de Bioquímica e Genética Aplicada (LBGA)-UFSCar ● Gram-positiva, formadora de esporos (PALMA; DIEGO HERMAN SAUKA; IBARRA, 2024) ● Produção de bacteriocina (PALMA; DIEGO HERMAN SAUKA; IBARRA, 2024) ● Sinergia com antimicrobianos (OLIVEIRA-SANTOS et al., 2023) ● Ação sobre microrganismos patogênicos (CAHAN; FRIMAN; NITZAN, 2008) <ul style="list-style-type: none"> ○ <i>Staphylococcus aureus</i> ○ <i>Escherichia coli</i>

1.2.4 Co-cultivo na produção de metabólitos secundários

Cultivos simples ou monocultura são limitados (BARBOSA e SOUSA, 2023) por diversos fatores como a incapacidade de uma única cepa expressar todas as vias enzimáticas, como o caso de compostos alvo com vias biossintéticas longas; formação de subprodutos indesejáveis, excesso de produção de cofatores ou ATP, podendo levar a uma limitação no crescimento dos microrganismos e até mesmo no desempenho de vias biossintéticas de compostos alvo (JONES; WANG, 2018; NGUYEN HUY THUAN et al., 2022). Muitos grupos de genes biossintéticos permanecem silenciosos em condições tradicionais de cultivo, ou seja, no cultivo simples, acarretando em isolamentos repetidos de compostos conhecidos (PENG et al., 2021).

Além disso, os microrganismos raramente existem isoladamente na natureza, interagindo constantemente com outros organismos em seu ambiente (TEMKIN et al., 2019). Suas interações podem ser mutualísticas, comensais ou antagônicas, por exemplo, microrganismos que vivem no mesmo ambiente podem competir por espaço e nutrientes, porém também podem cooperar para resistir a ambientes adversos (GAO et al., 2021).

O co-cultivo bacteriano, caracterizado por vários organismos heterogêneos, crescendo juntos em uma única fermentação, tem sido bastante explorado em estudos de ecologia microbiana, para entender as interações entre as espécies, o desenvolvimento de biofilmes multiespécies, a regulação da dinâmica das comunidades bacterianas e construção de comunidades sintéticas com funcionalidades específicas, além disso, pesquisadores estão utilizando co-cultivos para melhorar a eficiência da biossíntese (GAO et al., 2021; JONES; WANG, 2018).

O co-cultivo simula o ambiente complexo da vida microbiana na tentativa de ativar grupos de genes que podem estar silenciosos em cultivo simples, e assim explorar o potencial metabólico destes e obter novos metabólitos secundários bioativos (PENG et al., 2021). Muitos estudos de co-cultivo demonstraram compostos de biossíntese química não encontrados anteriormente em cultivos de uma única cepa (JONES; WANG, 2018).

Diversos produtos naturais com variadas e novas estruturas foram descobertos através da estratégia de co-cultivo, em combinações de fungo-fungo, fungo-bactéria e bactéria-bactéria (PENG et al., 2021). Entre os campos em que o co-cultivo trouxe inovações, se encontra a descoberta de moléculas antimicrobianas, em que as interações entre microrganismos podem provocar a produção de novas moléculas antimicrobianas não produzidas em monocultura (TEMKIN et al., 2019).

Dessa forma a estratégia de co-cultivo, demonstra grande potencial na busca por novos metabólitos bioativos e também na melhoria da produção de moléculas específicas a partir de microrganismos (PENG et al., 2021).

1.2.5 Biossíntese de nanopartículas de prata (AgNPs) e a atividade antimicrobiana

Metais são reconhecidos por suas propriedades antimicrobianas, nesse contexto, o estudo das nanopartículas metálicas tem sido explorado para tal fim, por seu tamanho e capacidade de se infiltrar em células bacterianas, e sua capacidade de produzir espécies reativas de oxigênio (ROS) quando em contato com células microbianas (PARAJE, 2023).

Nanopartículas metálicas (MNPs) demonstraram grande eficiência contra bactérias resistentes a medicamentos, impedindo sua proliferação, se tornando promissores candidatos para o futuro terapêutico de antimicrobianos, apresentando o potencial de aumentar a eficácia nos tratamentos e reduzir o aparecimento de resistência a antibióticos (BOGAS et al., 2022; SARAVANAN et al., 2023).

Nanocompósitos metálicos a base de prata, são bastante estudados quanto ao seu potencial antimicrobiano. A atividade antimicrobiana da prata (Ag), dos íons de prata (Ag⁺), e compostos de prata são conhecidas há bastante tempo por possuir um amplo espectro contra bactérias, fungos, vírus, entre outros (RUDRAMURTHY et al., 2016).

Porém, sua atividade antimicrobiana está diretamente ligada ao número de íons de prata biologicamente ativos liberados e sua disponibilidade para interação com a parede celular bacteriana. Nesse contexto, nanopartículas de prata (AgNPs) têm sido consideradas como um agente antimicrobiano alternativo aos íons de prata, por possuírem propriedades antimicrobianas superiores, sua maior proporção superfície-volume, permite interações aumentadas com a membrana celular e fácil penetração nas células (RUDRAMURTHY et al., 2016; KALANGADAN et al., 2022).

As AgNPs podem ser sintetizadas por métodos físicos, conhecidos como “top-down”, que envolvem a moagem do metal; químicos, também chamados de “bottom-up”, a partir de reações de redução, processos eletroquímicos e decomposição por ondas ultrassônicas e biológicos, que explora bactérias, fungos e extratos vegetais, também conhecido como um método “bottom-up”, envolve reações de oxidação ou redução por enzimas produzidas por microrganismos ou fitoquímicos (RUDRAMURTHY et al., 2016).

Os métodos físicos e químicos envolvem o uso de produtos químicos tóxicos e perigosos, além de possuir um processo caro, e com capacidade de acarretar diversos riscos biológicos. Como alternativa, foram realizados esforços para desenvolver uma síntese ecológica de nanopartículas, que não prejudicasse o meio ambiente, onde entram em cena os métodos de biossíntese (SARAVANAN et al., 2023; RUDRAMURTHY et al., 2016).

Muitas bactérias têm sido utilizadas para a síntese de nanopartículas, como por exemplo *Pseudomonas stutzeri*, *Bacillus megaterium*, *Escherichia coli*, *B. subtilis*, *B. marisflavi*, and *B. licheniformis*, entre outros (KLAUS et al., 1999; STANCU, 2021; EL SHANSHOURY; ELSILK; EBEID, 2011; SRINATH; NAMRATHA; BYRAPPA, 2018; NADAF; KANASE, 2019; SINGH et al., 2013).

1.2.5.1 Nanopartículas como indutores abióticos

Outra abordagem utilizando nanopartículas é o estudo destas como indutor abiótico na produção de metabólitos secundários. Estudos apontam que as nanopartículas podem impactar o crescimento microbiano, e apresentam atividades indutoras para o aumento da biossíntese de metabólitos secundários (AL-THEYAB et al., 2023).

Em um estudo em que foi analisada a produção de antibióticos da bactéria *S. coelicolor* na presença de nanopartículas de óxido de cobre, foi observado que em baixas concentrações de nanopartículas houve o aumento na produção de antibióticos, enquanto altas concentrações inibiram esse processo (LIU et al., 2019).

Capítulo 2 – Materiais e Métodos

2.1 Materiais

Os meios de cultura utilizados foram Caldo Triptona de Soja (TSB - KASVI), Agar Mueller Hinton (MH - KASVI), Caldo Mueller Hinton (MH - KASVI), International Streptomyces Project Medium (number 2) (ISP-2) composto por: 4 g.L⁻¹ glicose, 4 g.L⁻¹ extrato de levedura e 10 g.L⁻¹ extrato de malte em pH 7,2 e Yeast Peptone Mannitol medium (YPM) composto por: 16 g.L⁻¹ glicose, 11,25 g.L⁻¹ extrato de levedura, 11,25 g.L⁻¹ peptona e 20 g.L⁻¹ extrato de malte em pH 7,0).

2.1.1 Materiais biológicos

Os microrganismos utilizadas nesse estudo foram *Paenibacillus polymyxa* (CBMAI 2314) endofítico isolado das folhas de *Prunus* spp. por Serrano (2021), *Paenibacillus terrae* endofítico isolado das folhas *Tabebuia róseo-alba* por Romano (2014), *Bacillus thuringiensis* (Coleção do Laboratório de Bioquímica e Genética Aplicada (LBGA)-UFSCar), *Bacillus megaterium* (Coleção do Laboratório de Bioquímica e Genética Aplicada (LBGA)-UFSCar), Gram (-) *Escherichia coli* - ATCC 25922; Gram (+) *Staphylococcus aureus* – ATCC 25923 e o fungo leveduriforme *Candida albicans* – ATCC 10231 (Coleção do Laboratório de Bioquímica e Genética Aplicada (LBGA)-UFSCar).

Os testes com *Candida albicans*, foram realizados em laboratório NB-2 em colaboração com o Laboratório de Bioquímica e Genética Aplicada (LBGA)-UFSCar.

2.2 Preparo dos inóculos bacterianos

Os microrganismos teste, compostos pelas cepas de Gram (-) *Escherichia coli* - ATCC 25922; Gram (+) *Staphylococcus aureus* – ATCC 25923 e o fungo leveduriforme *Candida albicans* – ATCC 10231 foram reativados a partir da transferência de 100 µL de cepas contidas em estoque, suspensas em uma solução de meio de cultura com glicerol a 20%,

mantidas a uma temperatura de -80 °C, em 5 mL de caldo Triptona de Soja (TSB) e incubadas a 37 °C por 24h.

Os isolados *Bacillus thuringiensis* e *Bacillus megaterium*, foram reativados a partir da transferência de 100 µL de cepas contidas em estoque, suspensas em uma solução de meio de cultura com glicerol a 20%, mantidas a uma temperatura de -80°C, em 5 mL de caldo Triptona de Soja (TSB) e incubados a 37 °C por 24h, enquanto o isolado *Paenibacillus terrae*, foi incubado em 5 mL de meio ISP2 e o isolado *Paenibacillus polymyxa* em 5 mL de meio YPM ambos a 28 °C por 168h.

Para garantir a viabilidade das cepas utilizadas foram feitos repiques antes de cada ensaio, em meio de cultura sólido e em caldo.

2.3 Padronização dos inóculos

As culturas teste foram padronizadas através de análise por espectrofotometria (DO 625 nm) em que a escala esperada estava contida entre 0,08 e 0,1 para atingir a 0,5 de McFarland, equivalente a 1×10^8 UFC/mL; caso a medição da turvação fosse superior a 0,1, foi feita a diluição em solução salina 0,9% (CLSI, 2012).

2.4 Avaliação da bioatividade

2.4.1 Preparo dos cultivos simples

Para o preparo dos cultivos simples os inóculos foram padronizados e preparados em 5 mL do meio de cultivo utilizado para a reativação de cada isolado (5% (v/v)).

2.4.2 Preparo dos cultivos mistos para obtenção da fermentação

Foram preparados cultivos mistos em dois volumes iniciais de inóculo buscando avaliar se houve influência do volume de inóculo na atividade antimicrobiana dos cultivos (GAO et al., 2021). A primeira avaliação se deu considerando os dois endofíticos, *Paenibacillus terrae* e *Paenibacillus polymyxa* como principais pela sua atividade antimicrobiana constatada na literatura, utilizando assim uma maior proporção de volume de inóculo inicial com relação aos *Bacillus* (2:1); e a segunda avaliação, considerou o volume de inóculo igual para todos os microrganismos, como um método de comparação (1:1).

Para cada uma das situações, foram preparados 12 cultivos, que compreende 4 cultivos simples e 8 co-cultivos.

Cultivos simples: *Paenibacillus polymyxa* (PP); *Paenibacillus terrae* (PT); *Bacillus thuringiensis* (BT); *Bacillus megaterium* (BM);

Co-cultivos: *Paenibacillus polymyxa* e *Paenibacillus terrae* (C1); *Paenibacillus polymyxa* e *Bacillus thuringiensis* (C2); *Paenibacillus polymyxa* e *Bacillus megaterium* (C3); *Paenibacillus terrae* e *Bacillus thuringiensis* (C4); *Paenibacillus terrae* e *Bacillus megaterium* (C5); *Paenibacillus polymyxa*, *Paenibacillus terrae* e *Bacillus thuringiensis* (C6); *Paenibacillus polymyxa*, *Paenibacillus terrae* e *Bacillus megaterium* (C7); *Paenibacillus polymyxa*, *Paenibacillus terrae*, *Bacillus thuringiensis* e *Bacillus megaterium* (C8).

Na primeira situação, os endofíticos *Paenibacillus terrae* e *P. polymyxa* tomados como principais, foram inoculados em maior proporção em comparação ao *Bacillus thuringiensis* e *Bacillus megaterium*, com concentração final não ultrapassando o máximo de 10% (v/v) de inóculo em 5mL de meio. Para o co-cultivo de dois microrganismos foram inoculados 250 µL para os *Paenibacillus*, e 125 µL para os *Bacillus*; para o co-cultivo de três microrganismos 167 µL para os *Paenibacillus*, e 83 µL para os *Bacillus*; para o co-cultivo de quatro microrganismos 125 µL para os *Paenibacillus*, e 63 µL para os *Bacillus* (adaptado de GEA et al., 2022).

Na segunda situação, todos os microrganismos serão adicionados em proporções iguais de forma a atingir 10% (v/v) de inóculo em 5 mL de meio, portanto para o co-cultivo de dois microrganismos foram inoculados 250 µL de cada, para o co-cultivo de três microrganismos 167 µL de cada e para quatro microrganismos 125 µL de cada (GAO et al., 2021).

Para avaliar as condições dos cultivos mistos em relação à atividade antimicrobiana e tempo de cultivo, os cultivos foram incubados por um período de 168h, com medições a cada 24h (CAVICCHIOLI, 2021).

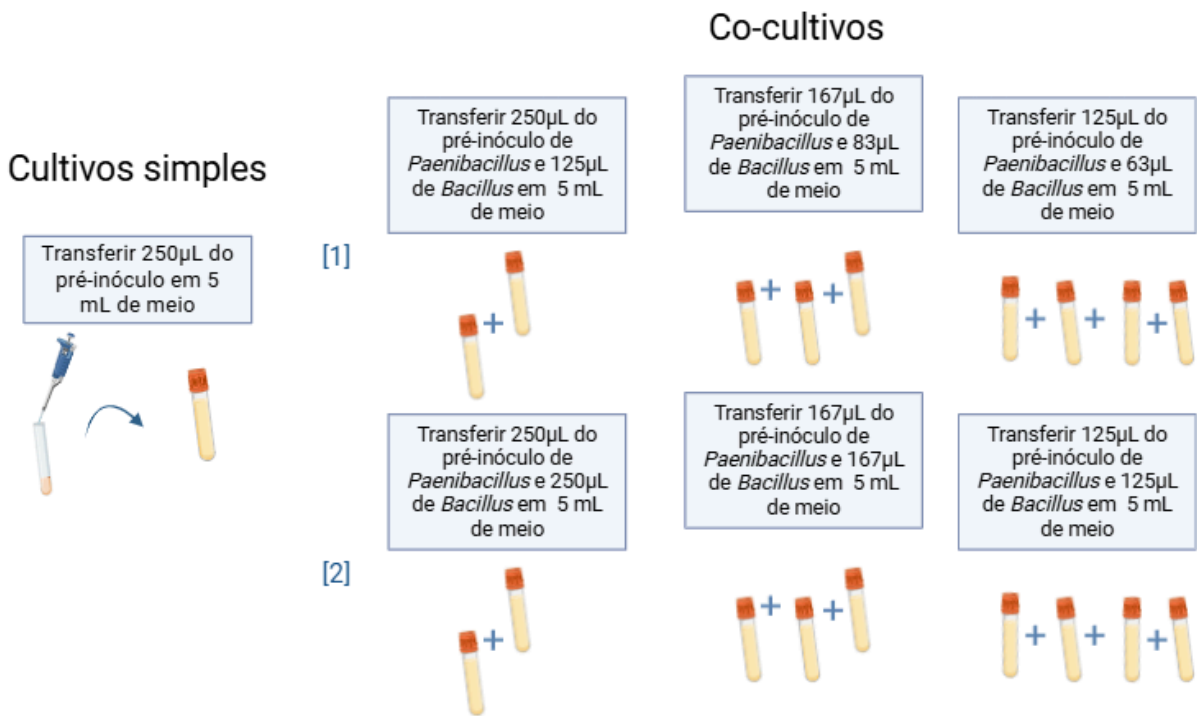


Figura 2: Esquema da montagem dos co-cultivos, com base no volume inicial de inóculo.

Fonte: Autoria própria, criado com BioRender.com.

2.4.3 Preparo dos caldos fermentados

Após o tempo de incubação, os caldos fermentados foram centrifugados a 12.000 rpm, por 15 min, para a separação do sobrenadante e das células microbianas. O sobrenadante livre de células, foi filtrado em filtro de 0,22 µm, para garantir a esterilidade. Todos os testes de atividade antimicrobiana foram realizados com o sobrenadante livre de células vivas.

2.4.4 Avaliação da atividade antimicrobiana pela metodologia de difusão em ágar por poço

Para o teste de difusão em ágar por poço, os três microrganismos teste, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e o fungo leveduriforme *Candida albicans*, foram semeados separadamente em placas (90x15mm) contendo meio de cultura ágar MH com o auxílio de swabs esterilizados buscando uma cobertura uniforme. Em seguida, poços equidistantes de 9 mm de diâmetro cada, foram realizados com o auxílio de uma ponteira esterilizada de 1000 µL em todas as placas. Posteriormente, foi feita a pipetagem de 100 µL do sobrenadante de cada cultivo nos pocinhos, em triplicata para cada um dos microrganismos teste (BAHAR ONARAN ACAR; ERMAN GÜLENDAG, 2023).

Após o tempo de espera de absorção do líquido pelo meio de cultura, as placas foram incubadas a 37 °C, por 24 h. Posteriormente, a medição dos halos de inibição foi realizada em milímetros, com o auxílio de um paquímetro.

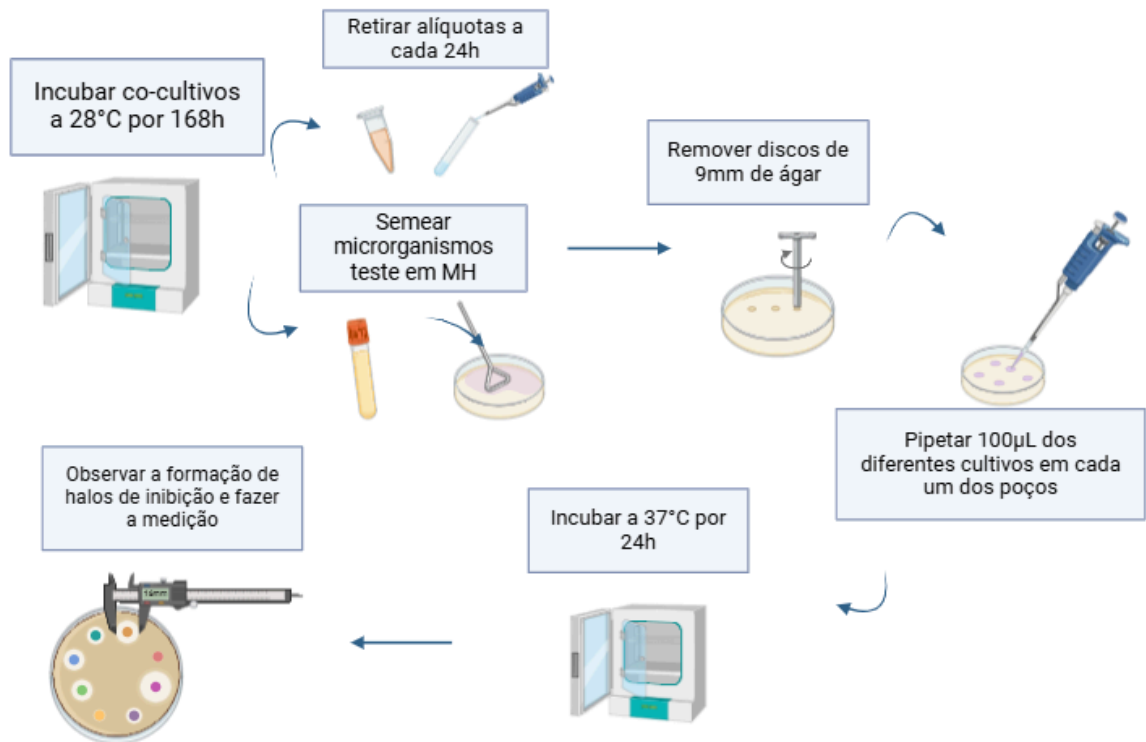


Figura 3: Esquema ilustrativo da análise da atividade antimicrobiana pelo método de difusão em ágar.

Fonte: Autoria própria, criado com BioRender.com.

2.4.5 Avaliação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM)

2.4.5.1 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

Para a concentração inibitória mínima foi realizado o ensaio em placa de microdiluição de 96 poços. Utilizando como microrganismos teste G – *Escherichia coli* - ATCC 25922; G + *Staphylococcus aureus* – ATCC 25923 e o fungo leveduriforme *Candida albicans* – ATCC 10231, sendo os inóculos padronizados com base na metodologia de *Clinical and Laboratory Standards Institute*, a 0,5 na escala de McFarland, e posterior diluição para alcançar a concentração final de aproximadamente 1×10^5 UFC/mL.

Em cada poço foram distribuídos 100 μL de caldo MH, posteriormente, foi feita a adição de 100 μL dos caldos fermentados ou nanopartículas a serem testadas, que após homogeneização, foram transferidos para a próxima linha e assim sucessivamente, até que fosse completada a diluição seriada, a partir da concentração inicial obtida pela liofilização dos caldos fermentados e as diluições testadas 1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32, obtendo as concentrações 6000, 3000, 1500, 750, 370 $\mu\text{L}/\text{mL}$ (CLSI, 2012).

O cálculo da concentração para o teste realizado com as nanopartículas foi realizado com base na concentração inicial obtida e as diluições testadas 1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32, 1/64, 1/128, 1/256, 1/512, 1/1024 e 1/2048. Em cada placa também estavam presentes o controle de crescimento e o controle de esterilidade do meio conforme os esquemas apresentados nas figuras 2 e 3.

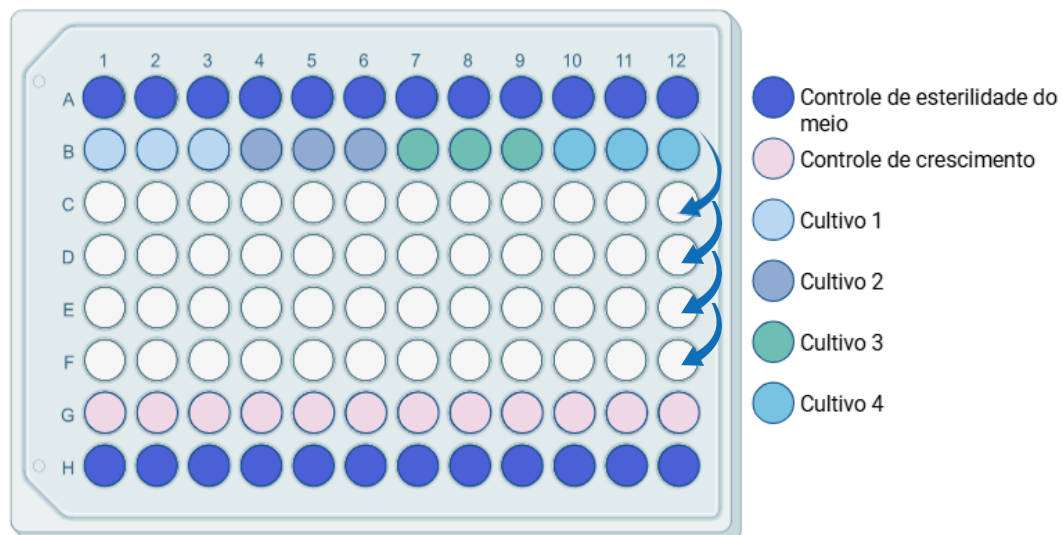


Figura 4: Layout utilizado para a análise de concentração inibitória mínima dos cultivos microbianos.

Fonte: Autoria própria, criado com BioRender.com.

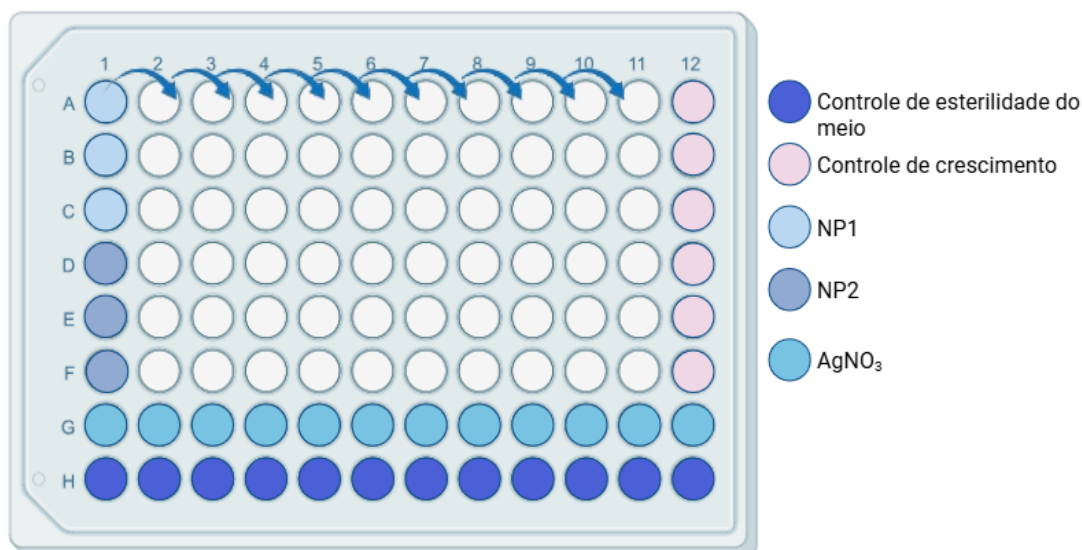


Figura 5: Layout utilizado para a análise de concentração inibitória mínima das nanopartículas.

Fonte: Autoria própria, criado com BioRender.com.

Posteriormente foi realizada a adição de 20 μL da suspensão bacteriana previamente preparada contendo os microrganismos teste, a todos os poços das microplacas, com exceção dos controles de esterilidade. As microplacas foram incubadas à 37°C por 20 horas e após o período de incubação, foram adicionados 20 μL do revelador Resazurina (SIGMA-ALDRICH, EUA) a 0,01% em cada poço, logo em seguida as placas foram armazenadas em local protegido de luz, e os resultados observados após 60 minutos. Sendo a leitura das placas realizada antes e depois da adição de resazurina nas absorvâncias 625 e 620 nm, respectivamente, em leitora automática de microplacas (Thermo Scientific™ Multiskan™ GO Microplate Spectrophotometer).

O princípio da adição de resazurina baseia-se na redução da resazurina, corante azul não fluorescente, em resorufina, um corante fluorescente rosa, pela atividade metabólica de células vivas.

Os cálculos da porcentagem de inibição foram realizados a partir da fórmula de FERREIRA et al., 2019:

$$\% \text{ Inibição do crescimento microbiano} = \left[1 - \left(\frac{A_c}{A_0} \right) \right] \times 100$$

A_c = média das absorvâncias por concentração de cada caldo testado.

A_0 = média das absorvâncias do controle de crescimento microbiano

2.4.5.2 Determinação da Concentração Bactericida Mínima (CBM)

Para a determinação da concentração bactericida mínima, antes de ser feita a adição do revelador nos poços da microplaca no teste de concentração inibitória mínima, foi feita a retirada de uma alíquota de 10 μ L de cada concentração e plaqueadas pelo método de microgota em ágar MH, posteriormente incubadas a 37 °C por 20h. A CBM foi definida pela menor concentração em que não houve crescimento bacteriano ((ANANDAN; VITTAL, 2018).

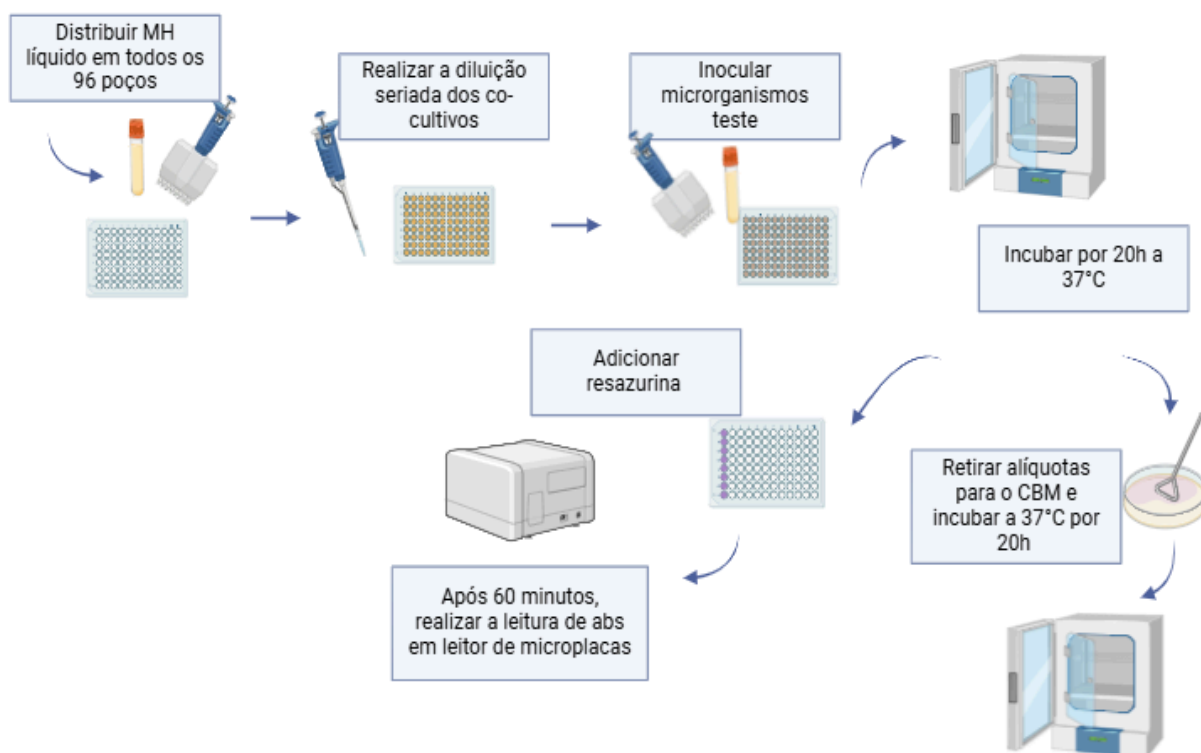


Figura 6: Esquema ilustrativo da análise da atividade antimicrobiana pelo método de microdiluição, para obtenção da concentração inibitória mínima e concentração bactericida mínima (CIM e CBM).

Fonte: Autoria própria, criado com BioRender.com.

2.5 Biossíntese de AgNPs

Para os melhores caldos de fermentação filtrados obtidos a partir da avaliação da atividade antimicrobiana, foi feita a adição de nitrato de prata (AgNO_3) 1 mM em Erlenmeyers em 50 mL de caldo, ocasionando soluções reacionais posteriormente incubadas a 28 °C em agitação de 120 rpm no escuro, durante 216h. A síntese das nanopartículas pode ser observada com a mudança de cor da reação de amarelo claro para marrom (ALFRYYAN et al., 2022).

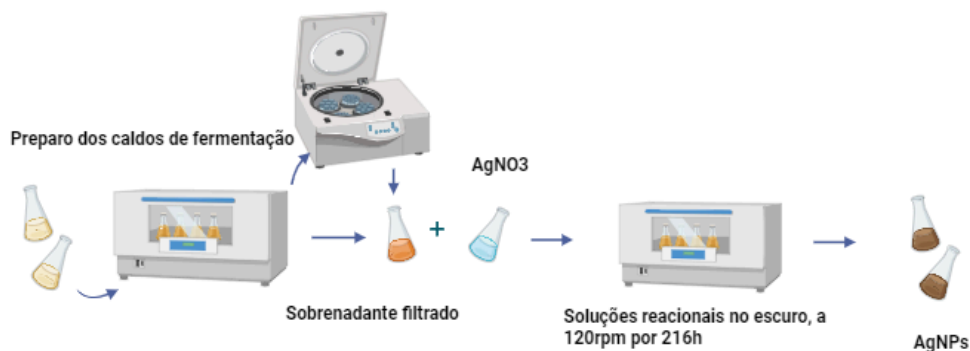


Figura 7: Esquema ilustrativo da biossíntese de nanopartículas de prata a partir dos cultivos microbianos.

Fonte: Autoria própria, criado com BioRender.com.

2.6 Caracterização das AgNPs

2.6.1 Caracterização por espectrofotometria UV-Visível

A caracterização por UV-vis foi realizada em leitor de microplacas (Thermo Scientific™ Multiskan™ GO Microplate Spectrophotometer) operando entre 200 e 800 nm.

A análise de UV-Vis torna possível identificar o espectro característico de cada tipo de nanoestrutura, e permite a confirmação da presença de nanopartículas, como as AgNPs, pois quando estas recebem radiação, os elétrons livres oscilam e são excitados, causando o fenômeno conhecido como ressonância plasmônica de superfície (SPR), sendo possível observar a presença de um pico característico das nanopartículas de prata acima de 400 nm (LIMA et al., 2025).

2.6.2 Caracterização por Análise de Rastreamento de Nanopartículas (NTA)

A análise foi realizada em parceria no Grupo de Nanomedicina e Nanotoxicologia (GNano) do Instituto de Física de São Carlos da Universidade de São Paulo (USP) sob coordenação do Prof. Dr. Valtencir Zucolotto. A caracterização por NTA foi empregada para quantificar as nanopartículas em solução (NanoSight NTA 3.4).

Pela taxa de movimento browniano detectada em frames pelo equipamento, é possível obter o tamanho aproximado das partículas entre 10 a 1000 nm de diâmetro, e através da contagem das partículas presentes por frame, é possível obter a concentração.

Todas as amostras foram diluídas em água destilada, as amostras PP(NPs), BT(NPs) e BM(NPs) foram diluídas em uma proporção de 1:1000 (v/v), e a amostra PT(NPs), foi diluída em proporção 2:1000 (v/v).

2.6.3 Caracterização por Dispersão Dinâmica de Luz (DLS)

As características coloidais de diâmetro hidrodinâmico médio (DH), índice de polidispersão (PDI) e potencial zeta de superfície (PZ) das AgNPs foram mensuradas em parceria no Grupo de Nanomedicina e Nanotoxicologia (GNano) do Instituto de Física de São Carlos da Universidade de São Paulo (USP) sob coordenação do Prof. Dr. Valtencir Zucolotto.

Para essas análises, as amostras BT e BM foram inicialmente diluídas na proporção de 1:1000 (v/v), e as amostras PP e PT foram diluídas na proporção de 1:100 (v/v) em água até um volume final de 1 mL, e então essa solução foi colocada em uma cubeta de poliestireno para ser inserida no equipamento.

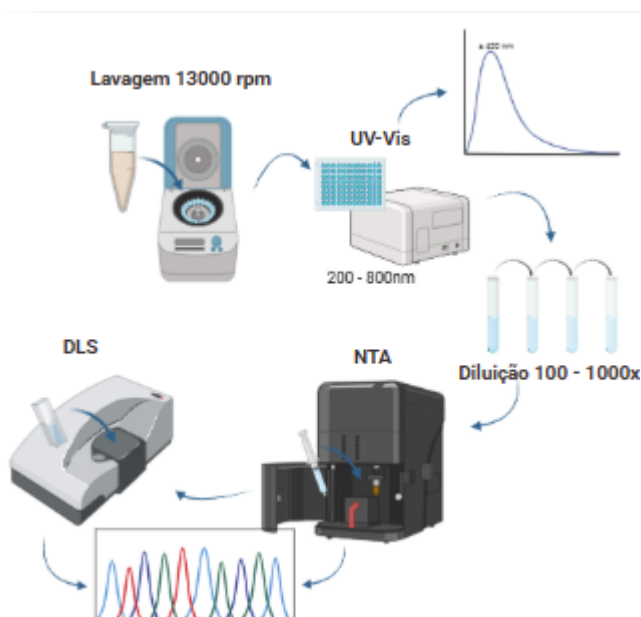


Figura 8: Esquema ilustrativo dos métodos utilizados para a caracterização das nanopartículas de prata.

Fonte: Autoria própria, criado com BioRender.com.

2.7 Análise da intervenção das nanopartículas nos cultivos simples e co-cultivos

Para essa etapa, as bactérias foram preparadas como descrito nos tópicos 2.4.1 e 2.4.2, e posteriormente cultivadas no meio de produção (10% (v/v)) do meio de cultura; co-cultivados com várias concentrações de AgNPs (0 ; $8,236 \times 10^8$; $1,647 \times 10^8$; $8,236 \times 10^7$,

$1,647 \times 10^7$ e $8,236 \times 10^6$ partículas/mL) a 30 °C em shaker orbital a 180 rpm (AL-THEYAB et al., 2023). Após seis dias de crescimento bacteriano, o caldo fermentado obtido foi testado com relação a sua atividade antimicrobiana pelos métodos de Avaliação da atividade antimicrobiana pela metodologia de difusão em ágar por poço (item 2.4.4) e Avaliação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM) (itens 2.4.5.1 e 2.4.5.2).

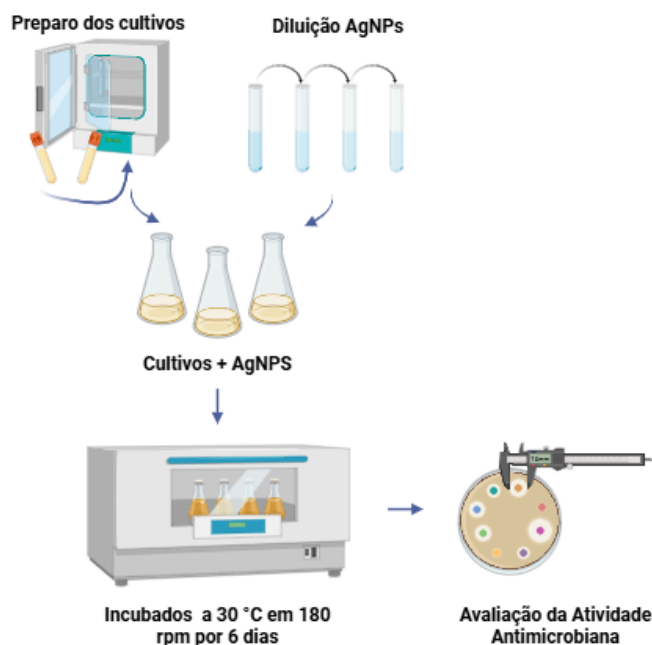


Figura 9: Esquema ilustrativo da análise da intervenção das nanopartículas nos cultivos simples e co-cultivos em função da atividade antimicrobiana observada, realizada pelo método de difusão em ágar.

Fonte: Autoria própria, criado com BioRender.com.

2.8 Análise dos efeitos dos caldos fermentados e nanopartículas de prata em linhagem celular humana (in vitro)

O efeito da citotoxicidade dos cultivos mistos e nanopartículas foi avaliado pelo método MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazólio).

Para isso as linhagens celulares de fibroblastos dérmicos humanos neonatais (HDFn), foram cultivadas em garrafas médias de cultura celular em meio Essencial Mínimo Modificado de Dulbecco (DMEM) na presença de antibióticos penicilina/streptomina a 100 µl/ml, com 10% de soro fetal bovino inativado pelo calor, e incubadas em ambiente úmido a 37 °C e 5% de CO₂ até atingirem 90% de confluência, sob passagens. Posteriormente, as

células foram semeadas em placas de 96 poços 1×10^4 células/poço em um volume final de 200 μL e incubadas por 24h antes do experimento.

Após a adesão das células ao fundo do poço, o meio foi descartado e foram adicionados por poço 100 μL de meio completo e 100 μL de cada cultivo e nanopartículas testados, por 24 h. Após o período de exposição, o meio foi removido e os poços foram lavados duas vezes com PBS 1X, 100 μL da solução MTT (5mg/mL) foi adicionada a cada poço, diluída em PBS 1X mais meio incompleto sem fenol (1:5), e incubada por 4 h em uma câmara úmida a 37°C e 5% de CO_2 (condições padrão de cultura).

Controles branco contendo apenas a solução de MTT e controle positivo (CTRL +) (morte) contendo extran 5% foram preparados. A solução reagente foi então removida, e 100 μL de diluente de DMSO foram adicionados por poço, seguidos pela leitura da absorbância a 570 nm em leitor de microplacas (Thermo Scientific™ Multiskan™ GO Microplate Spectrophotometer). A porcentagem de metabolismo celular foi calculada de acordo com a equação: valor individual \div valor médio do grupo CTRL \times 100.

$$\% \text{ citotoxicidade} = \frac{\text{Grupo experimental}}{\text{Média do grupo CTRL-}} \times 100$$

2.9 Análise estatística

Os dados obtidos neste estudo foram analisados por meio do GraphPad Prism 10.0 (San Diego, Califórnia, EUA). Aplicou-se o teste ANOVA (análise de variância) aos dados paramétricos e o pós-teste de comparações múltiplas de Tukey (os resultados foram apresentados em média e desvio padrão). Para dados não paramétricos, foram usados o teste de Kruskal-Wallis e o pós-teste de comparação múltipla de Dunn (os resultados foram apresentados como a mediana com os quartis superior e inferior: Me [Q1; Q3]). A significância estatística foi estabelecida em $p \leq 0,05$.

Capítulo 3 – Resultados e Discussão

3.1 Análise da atividade antimicrobiana dos cultivos em variação do tempo

Na avaliação da atividade antimicrobiana dos cultivos, procuramos entender se o tempo de cultivo e a concentração inicial de inóculo tem influência no diâmetro dos halos de inibição para cada um dos cultivos testados. E para isso, a partir de culturas padronizadas, volumes iniciais iguais e diferentes de inóculo foram testados para cada um dos co-cultivos,

por um período de incubação de 168h, em que uma alíquota era retirada a cada 24h, a fim de observar os maiores halos de inibição conforme descrito na metodologia 2.4.2.

Para a análise de tais resultados, a medição dos diâmetros de halo de inibição obtida em milímetros, foi submetida à análise estatística ($p \leq 0,05$) em que o tempo de cultivo apresentou diferença estatística entre os cultivos testados. O volume inicial de inóculo não demonstrou significância estatística, com relação ao diâmetro dos halos de inibição de maior valor. Por outro lado, essa diferença foi observada para o tempo de cultivo, havendo a ausência de atividade (figura 10). Os melhores tempos para cada cultivo, com relação ao diâmetro do halo obtido estão apresentados na tabela 3.

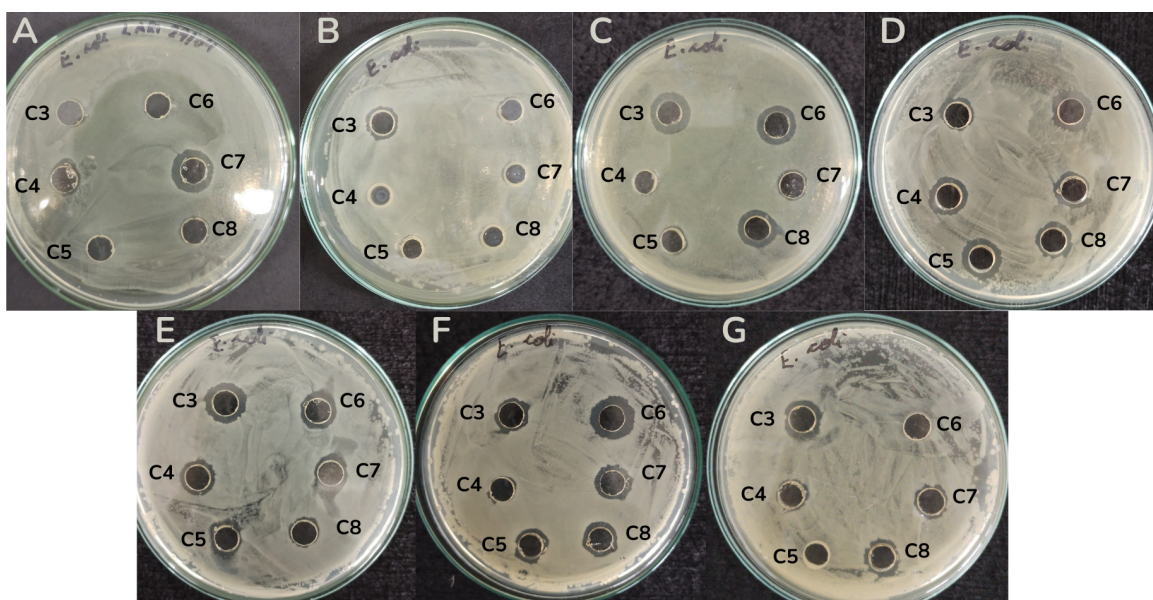


Figura 10: Halos de inibição indicando atividade antimicrobiana dos co-cultivos C3, C4, C5, C6, C7 e C8 contra a bactéria *E.coli*, variando pelo tempo de cultivo. A = 24h; B = 48h; C = 72h; D = 96h; E = 120h; F = 144h e G = 168h.

Tabela 3. Maior diâmetro de halo (mm) com relação ao melhor tempo de incubação para cada co-cultivo.

Cultivo	Tempo (h)	DHalo (mm)
C1	120	15
C2	120	15
C3	72	15
C4	96	13

C5	96	14
C6	144	14
C7	120	13
C8	72	13

Na figura 11 abaixo podemos observar os gráficos obtidos a partir de cada volume inicial de inóculo testado, em que se mostra igual a ausência de atividade antimicrobiana para as bactérias *Bacillus thuringiensis* e *Bacillus megaterium*, independente do tempo e proporção de inóculo, porém uma diferença significativa se mostra nos cultivos C4 e C5, em que nas proporções iguais de inóculo há menos resultados positivos (1:1), encontrado somente um pequeno halo para o cultivo C5 em 72h de cultivo, enquanto em proporções diferentes ambos os cultivos C4 e C5 apresentaram halos de inibição em diferentes tempos de cultivo, indicando que essas combinações podem apresentar uma interação que não estimula a produção de antimicrobianos quando em cultivo em proporções iguais.

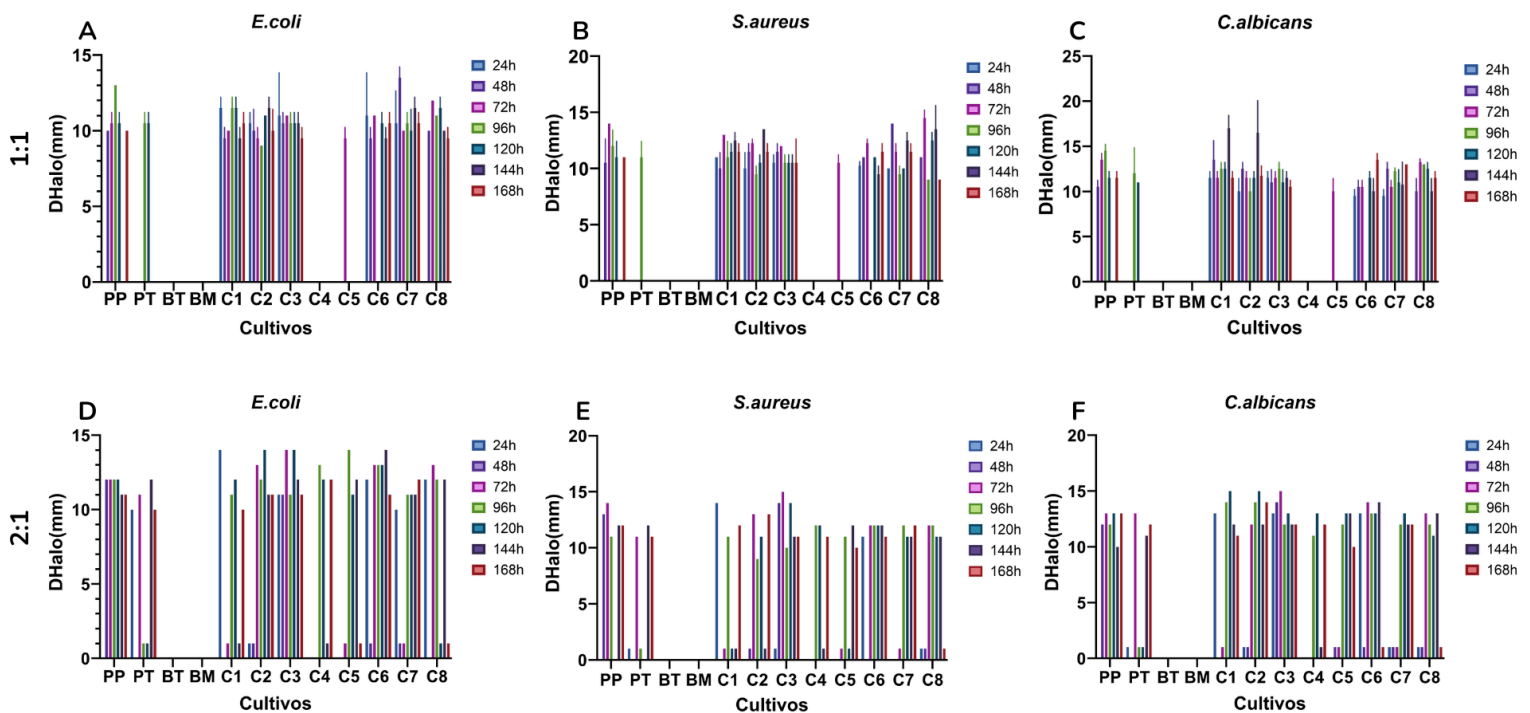


Figura 11: Gráficos da variação do diâmetro de halo de cada cultivo testado pelo tempo (24h -168h), em diferentes proporções iniciais de inóculo (1:1 e 2:1) com relação aos co-cultivos (C1, C2, C3, C4, C5, C6, C7 e C8). Os gráficos A, B e C, correspondem à proporção 1:1, e os gráficos D, E e F, correspondem a proporção 2:1. A e D = testes realizados contra a bactéria *E. coli*. B e E = testes realizados contra a bactéria *S. aureus*. C e F = testes realizados contra o fungo leveduriforme *C. albicans*.

Em estudo de Cavicchioli (2021), em que foi explorado o cultivo misto de *Paenibacillus polymyxa*, *E.coli*, *S.aureus*, *C.albicans*; o melhor tempo de cultivo foi estabelecido em 168h, enquanto no presente estudo, houve uma variação com relação ao cultivo, podendo indicar interações diferentes às apresentadas em trabalhos anteriores.

Quanto ao diâmetro dos halos em cultivo simples, *Paenibacillus polymyxa* apresentou 12 mm contra *E.coli*; 12,7 mm contra *S.aureus*, e não apresentou halos de inibição contra *C.albicans*, enquanto *Paenibacillus terrae* apresentou 8,6 mm contra *E.coli*; 9,4 mm contra *S.aureus* e 11,4 contra *C.albicans* (CAVICCHIOLI, 2017; BARBOSA, SOUSA, 2023).

Enquanto em co-cultivo com *E.coli*, *S.aureus* e *C.albicans*, *Paenibacillus polymyxa* apresentou halos de inibição de 13, 20 e 14 mm contra *E.coli*, *S.aureus* e *C.albicans*, respectivamente, apresentando halos maiores em comparação ao cultivo simples (CAVICCHIOLI, 2021). No caso de *P. terrae*, não detectou-se atividade antimicrobiana, quando em co-cultivo com *Bacillus thuringiensis*. Entretanto foram observados halos de inibição maiores do que o cultivo simples, quando em co-cultivo com *Bacillus megaterium*, de 10,6 e 9,5 mm contra *E.coli* e *S.aureus*, respectivamente (BARBOSA, SOUSA, 2023).

Essa ausência de atividade antimicrobiana quando *Paenibacillus terrae* foi cultivada com *Bacillus thuringiensis*, também pode ser observada no presente estudo pelos resultados observados no cultivo C5, composto pela mesma combinação de bactérias, quando o cultivo atendeu as mesmas condições do estudo de Barbosa (2023), com proporções de inóculo iguais e tempo de crescimento entre 24h - 48h, indicando que a interação dessas bactérias em proporções iguais afete a atividade antimicrobiana de *Paenibacillus terrae* e sua produção de metabólitos secundários.

No presente estudo, *Paenibacillus polymyxa* e *Paenibacillus terrae*, quando em co-cultivo com *Bacillus thuringiensis* e *Bacillus megaterium* alcançaram halos de inibição de 14, 15 e 15 mm, contra *E.coli*, *S.aureus* e *C.albicans*, respectivamente, apresentando resultados equiparáveis aos trabalhos anteriores, sendo melhor em comparação aos halos obtidos para *E.coli* e *C.albicans*.

No trabalho de Selvaraj et al. (2022), a melhoria no co-cultivo de *Bacillus* sp., aumentou a produção de ácido gálico em 26-27 vezes, em comparação a produção em cultivo simples. Tal composto apresentou atividade antimicrobiana contra *E.coli* e *S.aureus*, com zona de inibição de 20,4 e 16,5mm respectivamente, reforçando o potencial do co-cultivo no aumento da produção de compostos antimicrobianos.

3.2 Análise de Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM) dos cultivos simples e co-cultivos

A partir dos resultados obtidos na avaliação da bioatividade pelo tempo, os cultivos que apresentaram atividade antimicrobiana, foram incubados em seus respectivos tempos de cultivo em que apresentaram maiores halos de inibição, para a realização do ensaio de microdiluição e obtenção da concentração inibitória mínima.

Nos primeiros testes realizados, nenhum cultivo apresentou resultados significativos estatisticamente em comparação ao controle, através da metodologia de microdiluição, seguindo o mesmo procedimento realizado para os testes anteriores, em que os caldos fermentados foram centrifugados e filtrados. No entanto, ao testar os caldos sem o processo de esterilização por filtro, os cultivos C2, C3, C6 e C7 apresentaram resultados significativos ($p \leq 0,05$) como podemos observar na figura 12. Os cultivos simples PP e PT, e os co-cultivos C1, C4, C5, C8, não apresentaram resultados estatisticamente significativos ($p \leq 0,05$).

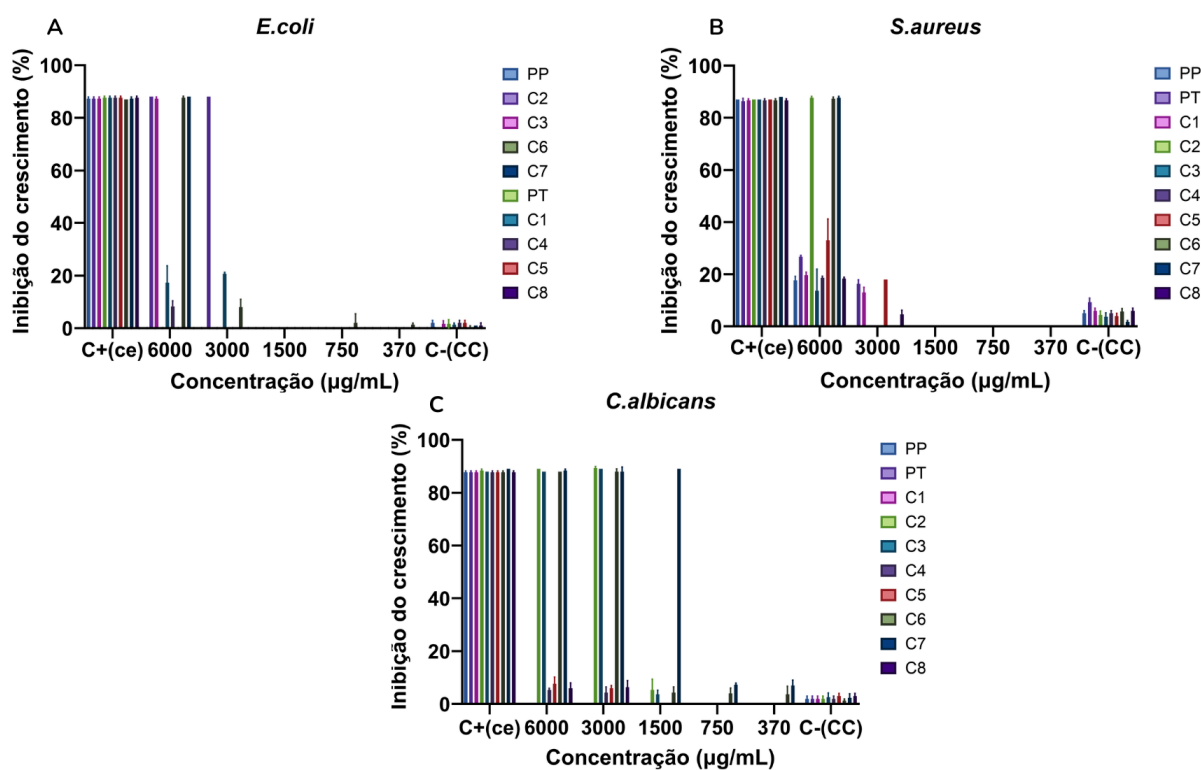


Figura 12: Gráficos da porcentagem de inibição do crescimento microbiano de cada cultivo testado (PP, PT, C1, C2, C3, C4, C5, C6, C7 e C8) contra as bactérias *E.coli*, *S.aureus* e *C.albicans*, em diferentes concentrações com relação aos controles. CE = controle de esterilidade. CC = controle de crescimento.

Para verificar se a atividade antimicrobiana poderia ter acontecido devido a uma interação célula-célula, e não pelos metabólitos secundários presentes no meio, foi feito um controle de esterilidade contendo os cultivos centrifugados, que pode ser observado no tópico 2.4.4.1.

Tal resultado pode indicar a presença de diferentes antimicrobianos dos presentes no teste anterior, que pode ser eliminado pelo processo de esterilização por filtração.

Resultado semelhante foi observado no estudo de Klaus et al. (2020), que buscou investigar a interação entre duas bactérias cultivadas juntas em meio líquido, para observar como o ambiente de competição pode induzir a produção de substâncias bioativas que não são observadas em cultivos individuais, o co-cultivo de *Burkholderia thailandensis* com *Bacillus subtilis* resultou na produção de um novo antimicrobiano, diferente do produzido em cultivo simples, que é eliminado pelo processo de esterilização por filtro.

O estudo de Serrano et al. (2021) mostrou que o caldo fermentado da bactéria *Paenibacillus polymyxa* apresentou atividade antimicrobiana contra bactérias Gram-positivas, Gram-negativas e um fungo, entre estes microrganismos estavam as bactérias *E. coli* (ATCC 25923) e *S. aureus* (ATCC 25922) e o fungo leveduriforme *C. albicans* (ATCC 10231). Os resultados de concentração inibitória mínima foram obtidos a partir dos antimicrobianos isolados AMP-Pp e Polycerradin. Para AMP-Pp os resultados de CIM observados foram de $7.8 \mu\text{g/mL}^{-1}$ quando testado contra *E.coli*, e não apresentou resultados positivos quando testado contra *S.aureus* e *C.albicans*. Já o antimicrobiano Polycerradin, apresentou a concentração mínima inibitória em $1.97 \mu\text{g/mL}^{-1}$, $3.95 \mu\text{g/mL}^{-1}$ e $3.95 \mu\text{g/mL}^{-1}$ contra *E.coli*, *S.aureus* e *C.albicans*, respectivamente (SERRANO, 2021).

Outro estudo demonstrou a atividade antimicrobiana de *Paenibacillus polymyxa*, contra as bactérias *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e o fungo *Candida albicans* com concentrações inibitórias mínimas de $156 \mu\text{g/mL}^{-1}$, $400 \mu\text{g/mL}^{-1}$ e $1250 \mu\text{g/mL}^{-1}$, respectivamente, porém estes resultados também são dos antimicrobianos isolados e concentrados (ABDELHAMID, 2022).

Tal resultado não foi observado no presente estudo, em que a bactéria *Paenibacillus polymyxa* não apresentou inibição do crescimento para *E.coli* e *C. albicans* mesmo na maior concentração testada de $6000 \mu\text{g/mL}^{-1}$, e apresentou uma porcentagem de inibição baixa para a *S.aureus*.

Diante dos resultados obtidos a partir do teste de microdiluição, selecionamos os cultivos C2, C3, C6 e C7 para dar continuidade ao trabalho, que foram os que apresentaram resultados estatisticamente significativos.

Para a obtenção da concentração, foi feita a liofilização dos caldos fermentados. A partir da concentração, obtivemos a concentração inibitória mínima, que pode ser observada na tabela 4:

Tabela 4. Concentração Inibitória Mínima e porcentagem de inibição dos co-cultivos com atividade antimicrobiana significativa.

Cultivo	CIM ($\mu\text{L}/\text{mL}$)	%Inibição	CBM ($\mu\text{L}/\text{mL}$)	Microrganismo
C2	3000	88.092	6000	<i>E. coli</i>
C2	6000	87.961	6000	<i>S. aureus</i>
C2	3000	89.128	3000	<i>C. albicans</i>
C3	6000	87.628	6000	<i>E. coli</i>
C3	3000	88.987	3000	<i>C. albicans</i>
C6	6000	87.513	6000	<i>E. coli</i>
C6	6000	87.430	6000	<i>S. aureus</i>
C6	3000	87.952	3000	<i>C. albicans</i>
C7	6000	87.970	6000	<i>E. coli</i>
C7	6000	88.122	6000	<i>S. aureus</i>
C7	1500	89.135	1500	<i>C. albicans</i>

A confirmação dos resultados se deu pela medida de absorbância dos cultivos obtidos e posterior análise estatística. Também de modo visual pela adição do corante resazurina, que possui uma cor azul, e em contato com células vivas sua coloração se torna rosa, de tal forma foi possível observar a atividade antimicrobiana pela coloração azul nos poços em que os cultivos foram testados, como pode ser constatado na figura 13:

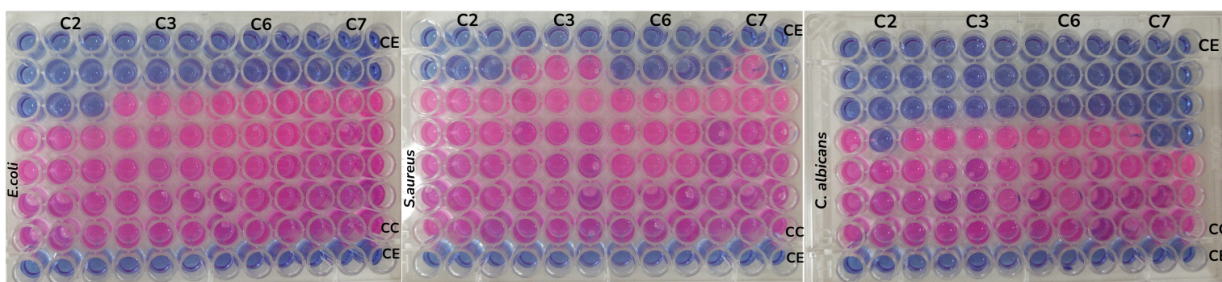


Figura 13: Resultado da concentração mínima inibitória, após a adição de resazurina, para os cultivos C2, C3, C6 e C7 em triplicata, contra as bactérias *E.coli*, *S.aureus* e *C.albicans*. Em azul podemos observar os poços em que houve a inibição microbiana. CE = controle de esterilidade. CC = controle de crescimento microbiano.

Através da análise estatística foi possível observar a diferença entre os resultados obtidos de CIM para os co-cultivos em comparação com os cultivos simples testados, em que foi demonstrado que os co-cultivos C2, C3, C6 e C7 apresentaram resultados melhores em comparação aos outros cultivos testados ($p \leq 0,05$). Podemos observar tais resultados na figura 14:

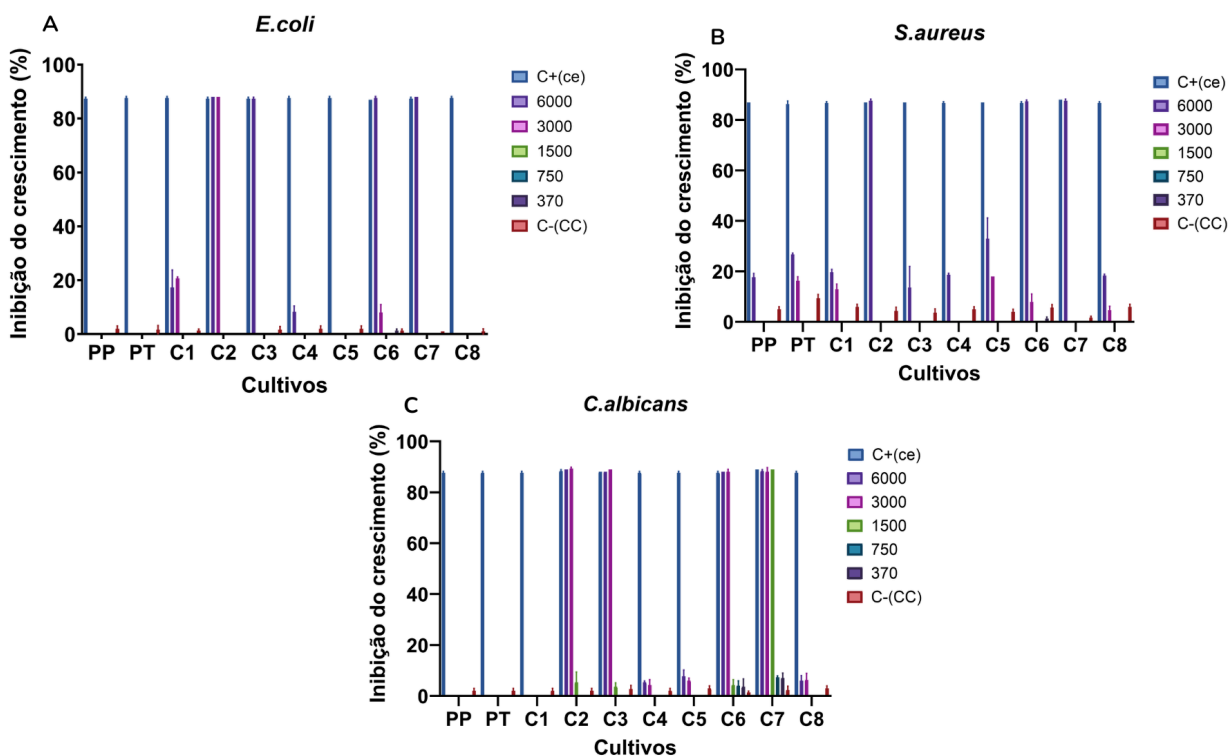


Figura 14: Gráficos da porcentagem de inibição do crescimento microbiano de cada cultivo testado nas concentrações 6000, 3000, 1500, 750, 370 ($\mu\text{L}/\text{mL}$), contra as bactérias *E.coli*, *S.aureus* e *C.albicans*. CE = controle de esterilidade. CC = controle de crescimento.

No estudo de Sung et al. (2017), em que foi feito o co-cultivo da espécie *Streptomyces* sp. PTY08712 com *Bacillus subtilis* (BS), *Staphylococcus aureus* sensível à meticilina (MSSA), *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA) e *Pseudomonas aeruginosa* (PA), foram testados contra *Bacillus subtilis* (BS), *Staphylococcus aureus* sensível à meticilina (MSSA), *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA) e *Pseudomonas aeruginosa* (PA), nenhum dos cultivos apresentaram atividade antimicrobiana contra

Pseudomonas aeruginosa, porém, todos demonstraram atividade igual ao cultivo simples ou aumentada quando em co-cultivo contra os patógenos Gram-positivos. Sendo que o co-cultivo, com MRSA, resultou em atividade antimicrobiana mais significativas com valores de CIM 16X, 4X e 8X maiores do que o cultivo simples, contra *Bacillus subtilis*, MSSA e MRSA, respectivamente.

Foram obtidos resultados satisfatórios também para o co-cultivo com *Bacillus subtilis*, com valores de CIM de 4X, 2X e 2X mais potentes em comparação com o cultivo simples contra BS, MSSA e MRSA, respectivamente. O co-cultivo com MSSA não resultou em uma atividade biológica aumentada (SUNG; GROMEK; BALUNAS, 2017).

No presente estudo, foram obtidos resultados semelhantes, em que o cultivo simples não apresentou atividades antimicrobianas significativas utilizando a metodologia de microdiluição, para obtenção da Concentração Mínima Inibitória, porém, os cultivos C2, C3, C6 e C7, apresentaram atividade antimicrobiana em menores concentrações.

Também foi possível analisar a diferença entre a atividade antimicrobiana dos cultivos C2, C3, C6 e C7 com relação aos microrganismos testados. Para *E.coli*, o cultivo C2 apresentou melhores resultados, enquanto para *S.aureus*, os cultivos com resultados positivos C2, C6 e C7, não apresentaram diferença estatística. E para *C.albicans*, o cultivo C7 apresentou resultados mais promissores, sendo também a maior atividade antimicrobiana observada, com uma menor CIM. De forma geral os cultivos C3, C6 e C7 apresentaram maior atividade antimicrobiana contra o microrganismo *C.albicans*.

Em estudo de Cavicchioli (2021), todos os cultivos mistos testados, obtiveram uma atividade antimicrobiana maior com relação ao cultivo simples. A concentração mínima inibitória encontrada para o cultivo misto de *P. polymyxa* com *S. aureus* quando testado contra *E.coli* foi de 1250 $\mu\text{g/mL}^{-1}$ com uma inibição de 92,86% enquanto na mesma concentração o cultivo simples de *P. polymyxa* apresentou uma inibição de 18,58%. Para a bactéria *S.aureus*, o cultivo simples *P. polymyxa* apresentou uma inibição de 4,49% na concentração de 1250 $\mu\text{g/mL}^{-1}$, e na concentração 2500 $\mu\text{g/mL}^{-1}$, uma inibição de 59,13%; já para os cultivos mistos de *P. polymyxa* com *S. aureus*, a inibição foi de 44,79% e 62,28%, nas mesmas concentrações, respectivamente; e para o cultivo misto de *P. polymyxa* com *E.coli*, a inibição observada foi de 51,78%, 82,50% e 87,08%, nas concentrações 1250, 2500 e 5000 $\mu\text{g/mL}^{-1}$ respectivamente, sendo o mais eficaz contra *S.aureus* (CAVICCHIOLI, 2021).

Resultado semelhante foi observado no presente estudo, em que alguns dos co-cultivos testados apresentaram uma porcentagem de inibição superior ao obtido nos cultivos simples (figura 14).

3.3 Análise da biossíntese e caracterização de nanopartículas de prata (AgNPs)

Foi testada a capacidade dos cultivos simples (PP, PT, BT e BM) e dos co-cultivos selecionados anteriormente (C2, C3, C6 e C7) para a biossíntese de nanopartículas de prata. A confirmação dessa síntese foi verificada pela mudança de cor do meio para um característico marrom escuro (figura 15) e pela análise em espectrofotômetro UV-Vis, em que foi observado um pico na faixa de 400 - 480 nm, espectro de absorção das AgNPs, tal pico não pode ser observado em caso de ausência das nanopartículas (AL-ASBAHI et al., 2024).

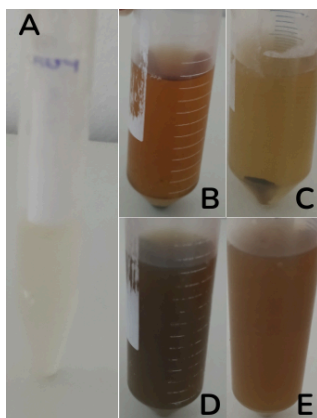


Figura 15: Coloração observada para cada solução reacional de nanopartículas de prata. A = Solução reacional antes da síntese. B = Solução reacional a partir do cultivo PP. C = Solução reacional a partir do cultivo PT. D = Solução reacional a partir do cultivo BT. E = Solução reacional a partir do cultivo BM.

Os resultados positivos, que puderam ser confirmados pela análise de UV-Vis, foram obtidos apenas para os cultivos simples, PP, PT, BT e BM (figura 16), indicando que a interação das bactérias no co-cultivo, pode ter limitado a capacidade das bactérias para a redução da prata, e dessa forma, limitou a síntese das nanopartículas. Resultados diferentes dos encontrados na literatura, em que o co-cultivo, também chamado de consórcio de bactérias, levou a um melhor rendimento na síntese de nanopartículas em comparação com os cultivos simples (AL-ASBAHI et al., 2024).

Os picos da banda de absorção do plasmon para os cultivos testados se deu em 412, 431 e 450 nm, confirmando a presença de nanopartículas, estando em consonância com outros trabalhos em que foi estudada a biossíntese de nanopartículas de prata, com picos em 430 nm (PANDIAN et al., 2021), entre 410-430 nm (AL-ASBAHI et al., 2024), entre 415-425 nm (TREGUBOVA et al., 2022) e entre 410 e 450 nm para espécies de *Bacillus* e *Paenibacillus* (ABD EL-RAHEEM et al., 2022).

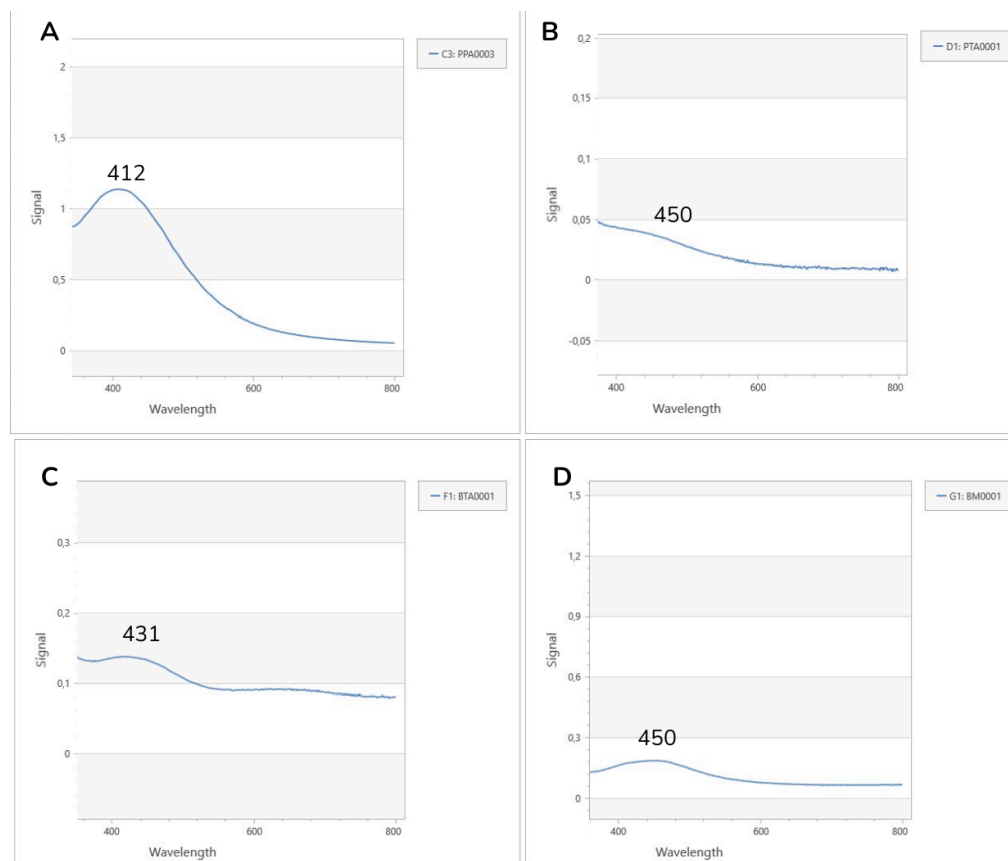


Figura 16: Gráficos obtidos através da análise por espectrofotometria (UV-Vis) operando entre 200 e 800 nm, demonstrando o pico entre 412 - 450 nm, indicando a presença de nanopartículas de prata para os diferentes cultivos utilizados para a biossíntese. A = Solução reacional a partir do cultivo PP. B = Solução reacional a partir do cultivo PT. C = Solução reacional a partir do cultivo BT. D = Solução reacional a partir do cultivo BM.

Podemos observar que a intensidade dos picos obtidos foi diferente para cada solução reacional utilizada, indicando diferentes concentrações de nanopartículas presentes no meio. Esses resultados foram confirmados pela Análise de Rastreamento de Nanopartículas (NTA), utilizada como uma das formas de caracterizar as nanopartículas sintetizadas. Com o NTA,

obtivemos uma estimativa do tamanho e da concentração de partículas por mL de cada solução reacional, dados que podem ser observados na tabela 5.

Tabela 5. Tamanho (nm) e concentração (partículas/mL) de nanopartículas presentes em cada solução reacional. Para a praticidade de identificação, cada solução reacional foi identificada com o nome do cultivo utilizado para a biossíntese.

AgNP	Tamanho (nm)	Concentração (partículas/ mL)
PP	176.1 ± 19.7	1.19×10 ¹¹ ± 4.68×10 ⁹
PT	257.0 ± 35.2	5.56×10 ¹⁰ ± 1.91×10 ¹⁰
BT	147.6 ± 28.3	9.06×10 ¹⁰ ± 7.09×10 ⁹
BM	124.7 ± 12.4	3.96×10 ¹¹ ± 4.39×10 ¹⁰

Podemos observar que os cultivos que apresentaram maior rendimento na síntese de nanopartículas de prata foram PP e BM. Quanto ao tamanho, todas as nanopartículas testadas foram maiores que 100 nm, estando entre 124 e 257 nm (figura 17), porém foram observados aglomerados de nanopartículas durante a realização do NTA, portanto para a confirmação do resultado foi realizado o DLS (tabela 6).

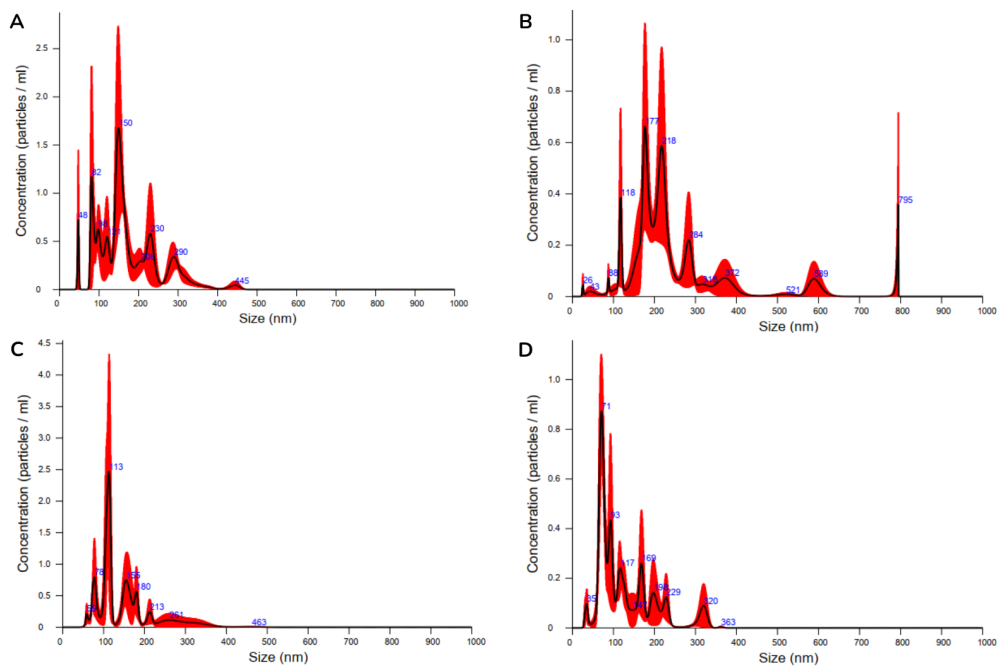


Figura 17: Gráficos obtidos a partir da Análise de Rastreamento de Nanopartículas, em que podemos observar o tamanho das partículas (nm) e sua concentração para cada tamanho encontrado. A = Nanopartículas sintetizadas a partir do cultivo PP. B = Nanopartículas sintetizadas a partir do cultivo PT. C = Nanopartículas sintetizadas a partir do cultivo BT. D = Nanopartículas sintetizadas a partir do cultivo BM.

Tabela 6. Tamanho (nm), PDI e potencial Zeta (mV) das nanopartículas em meio líquido. Para a praticidade de identificação, cada solução reacional foi identificada com o nome do cultivo utilizado para a biossíntese.

AgNP	Tamanho (nm)	PDI	Zeta (mV)
PP	342.7 ± 47.17	0.673 ± 0.063	-32.74 ± 1,077
PT	566.5 ± 64.27	0.584 ± 0.022	-30.08 ± 1,129
BT	140.9 ± 68.76	0.440 ± 0.0423	-16.46 ± 0.678
BM	210.8 ± 16.64	0.391 ± 0.048	-21.13 ± 1,62

As amostras de nanopartículas de prata BT e BM foram diluídas em 1000x. As amostras PP e PT não apresentaram resultados confiáveis na mesma diluição portanto foram diluídas 100x vezes, esse pode ser um dos motivos para a diferença do tamanho das partículas observados anteriormente pelo NTA, porém também podem ter relação com a estabilidade das nanopartículas, e sua tendência a formar aglomerados. O tamanho mais próximo nos dois testes foi o obtido para a amostra BT, em que o valor foi próximo de 140 nm.

Em outros trabalhos listados na literatura em que nanopartículas de prata foram biossintetizadas por bactérias do gênero *Bacillus* e *Paenibacillus* com um pico em UV-Vis entre 410–430 nm, apresentou tamanhos de partículas entre 4.65–11.3 nm (AL-ASBAHI et al., 2024), com resultados de UV-Vis entre 410 e 450, apresentaram tamanhos entre 3.01-16.47nm (ABD EL-RAHEEM et al., 2022), UV-Vis entre 415–425 nm, com tamanho de partículas de 15nm, com extremos de 10 e 40 nm (TREGUBOVA et al., 2022), e por fim UV-Vis de 416 nm e tamanho de partículas entre 17.49 e 52.85 nm (SREENIVASA et al., 2021).

Diante desses resultados, esperava-se um tamanho menor de nanopartículas, visto que os picos obtidos no teste de UV-Vis no presente trabalho estão dentro dos valores observados nos outros trabalhos. Os índices de polidispersão (PDI) obtidos para todas as amostras, indicam uma distribuição polidispersa com uma dispersão moderada, ou seja, existem diferentes tamanhos de partículas presentes no meio (GEVORGYAN et al., 2022). Tal

resultado pode indicar a presença de aglomerados, de algum outro fator que esteja interferindo na determinação do tamanho real das partículas, ou que a biossíntese levou a diferentes tamanhos de partícula, para cada uma das amostras testadas.

No trabalho de Tregubova et al. (2022), em que nanopartículas de prata foram biossintetizadas com exopolissacarídeos de *Paenibacillus polymyxa*, houve a formação característica de aglomerados de partículas.

O potencial Zeta indica a carga das partículas, e todas as partículas sintetizadas no presente trabalho apresentam cargas negativas, com valores entre -16 e -32 mV. NPs com valores de potencial zeta menores que +25 mV e maiores que -25 mV tendem a formar agregados mediados pelas interações interpartículas, e um grande valor de potencial zeta positivo e um grande valor de potencial zeta negativo indicam alta estabilidade das partículas condicionadas por forças repulsivas substanciais que também impedem a agregação (GEVORGYAN et al., 2022).

Este potencial não pode ser observado no presente trabalho, indicando uma estabilidade baixa e/ou moderada das nanopartículas, assim como observado no estudo de Lima et al. (2025), que obteve valores de potencial Zeta de -38.1 mV e -34.9 mV, ao fazer a síntese verde de nanopartículas de prata a partir do extrato das folhas de *Paullinia cupana Kunth*.

Entretanto, o estudo de Carvalho (2020) demonstrou tamanhos médios 262 nm e 372 nm para nanopartículas de ouro sintetizadas pelas mesmas cepas de *Paenibacillus polymyxa* e *Paenibacillus terrae*, respectivamente, estando mais próximo dos valores obtidos para a biossíntese realizada pelas mesmas bactérias no presente trabalho.

Posteriormente a caracterização, a partir da concentração inicial das nanopartículas obtidas pelo NTA, foi feito o teste de microdiluição (figura 19) para obter a CIM de cada nanopartícula. Na figura 18, apresentamos os gráficos referentes as diluições em que foi observada a inibição antimicrobiana com significância estatística, com base nessas diluições foi possível determinar as concentrações inibitórias mínimas, os dados obtidos estão listados na tabela 7.

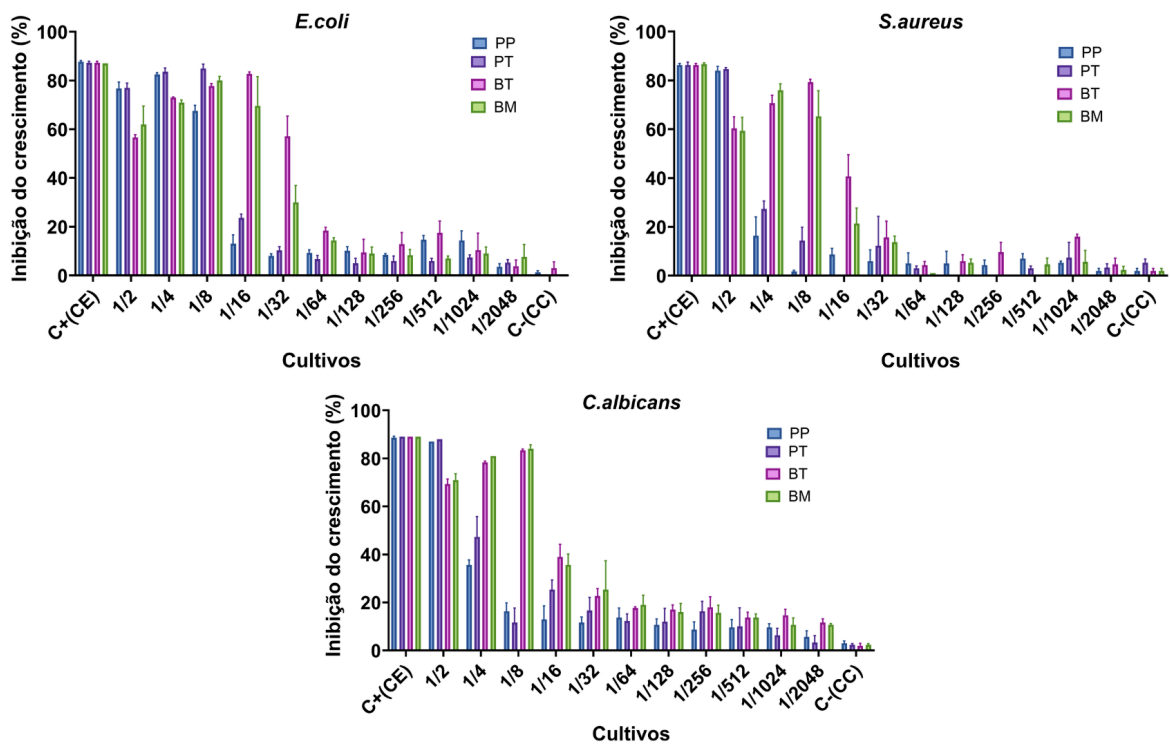


Figura 18: Gráficos da porcentagem de inibição do crescimento microbiano de cada nanopartícula testada (PP, PT, BT e BM) contra as bactérias *E.coli*, *S.aureus* e *C.albicans*, em diferentes diluições com relação aos controles. CE = controle de esterilidade. CC = controle de crescimento.

Tabela 7. Concentração Inibitória Mínima e porcentagem de inibição das AgNPs.

AgNP	CIM (partículas/ mL)	Inibição (%)	CBM (partículas/ mL)	Microrganismo
PP	$1,19 \times 10^{11}$	82.532	$5,95 \times 10^{10}$	<i>E.coli</i>
PP	$5,95 \times 10^{10}$	83.900	$5,95 \times 10^{10}$	<i>S.aureus</i>
PP	$5,95 \times 10^{10}$	86.916	-	<i>C.albicans</i>
PT	$2,78 \times 10^{10}$	86.319	-	<i>E.coli</i>
PT	$2,78 \times 10^{10}$	84.778	-	<i>S.aureus</i>
PT	$2,78 \times 10^{10}$	87.968	-	<i>C.albicans</i>
BT	$2,27 \times 10^{10}$	82.793	$1,13 \times 10^{10}$	<i>E.coli</i>
BT	$1,13 \times 10^{10}$	79.284	$1,13 \times 10^{10}$	<i>S.aureus</i>
BT	$1,13 \times 10^{10}$	83.147	$2,27 \times 10^{10}$	<i>C.albicans</i>
BM	$1,98 \times 10^{11}$	81.350	$9,9 \times 10^{10}$	<i>E.coli</i>
BM	$9,9 \times 10^{10}$	75.762	-	<i>S.aureus</i>

Com base nas CIM e CBM obtidas para cada nanopartícula podemos observar que as nanopartículas sintetizadas a partir do cultivo BT, apresentaram uma menor concentração inibitória e bactericida contra os três microrganismos testados, em comparação com as outras nanopartículas, apesar de não ser o cultivo com melhor rendimento de síntese. Que pode ter relação com o tamanho das partículas, sendo que partículas menores têm uma tendência a ter uma melhor atividade antimicrobiana devido a sua maior área de superfície externa (AL-ASBAHI et al., 2024).

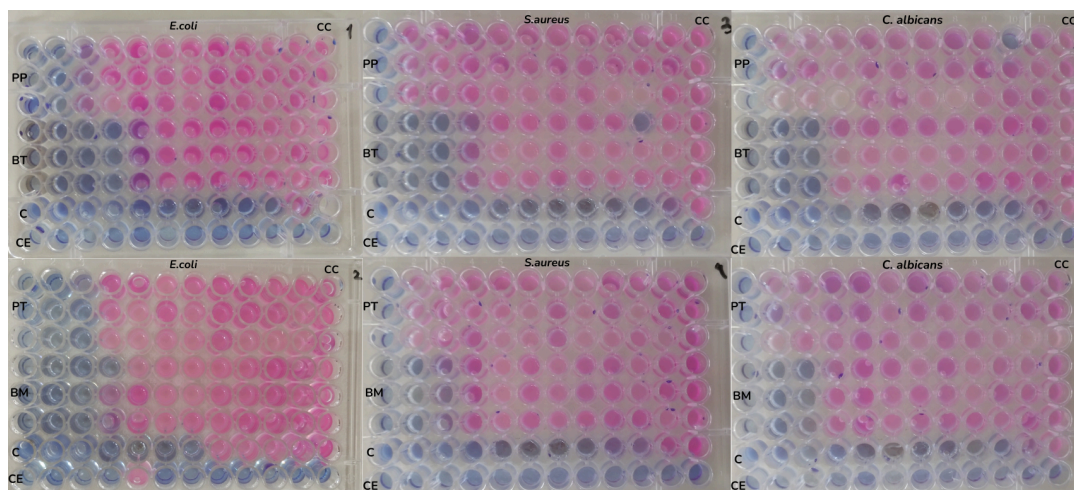


Figura 19: Resultado da concentração mínima inibitória, após a adição de resazurina, para as soluções reacionais a partir dos cultivos PP, PT, BT e BM em triplicata, contra as bactérias *E.coli*, *S.aureus* e *C.albicans*. Em azul podemos observar os poços em que houve a inibição microbiana. CE = controle de esterilidade. CC = controle de crescimento microbiano. C = AgNO_3 .

3.4 Análise do estímulo das nanopartículas nos cultivos simples e co-cultivos

Essa análise buscou verificar se pequenas concentrações de nanopartículas podem estimular a atividade antimicrobiana dos cultivos. Para isso um teste de atividade antimicrobiana pelo método de difusão em ágar foi realizado com os co-cultivos, com atividade estatisticamente significativa dos testes anteriores (C2, C3, C6 e C7), e um cultivo simples (PP), em adição a pequenas concentrações da nanopartícula (BT) com menor MIC encontrado anteriormente, contra os três microrganismos testados.

Neste teste, foi possível observar que somente o cultivo PP apresentou uma diferença estatisticamente significativa ($p \leq 0,05$) na adição de $8,236 \times 10^8$ partículas/mL, em comparação com o controle que não continha nanopartículas no meio contra os três microrganismos *E.coli*, *S.aureus* e *C.albicans* (figura 20). Apresentando halos de inibição para o controle de 11,67 mm, 13 mm e 12,33 mm, contra *E.coli*, *S.aureus* e *C.albicans*, respectivamente, enquanto na adição de nanopartículas 15 mm, 15,33 mm e 14,33 mm, também contra *E.coli*, *S.aureus* e *C.albicans*, respectivamente.

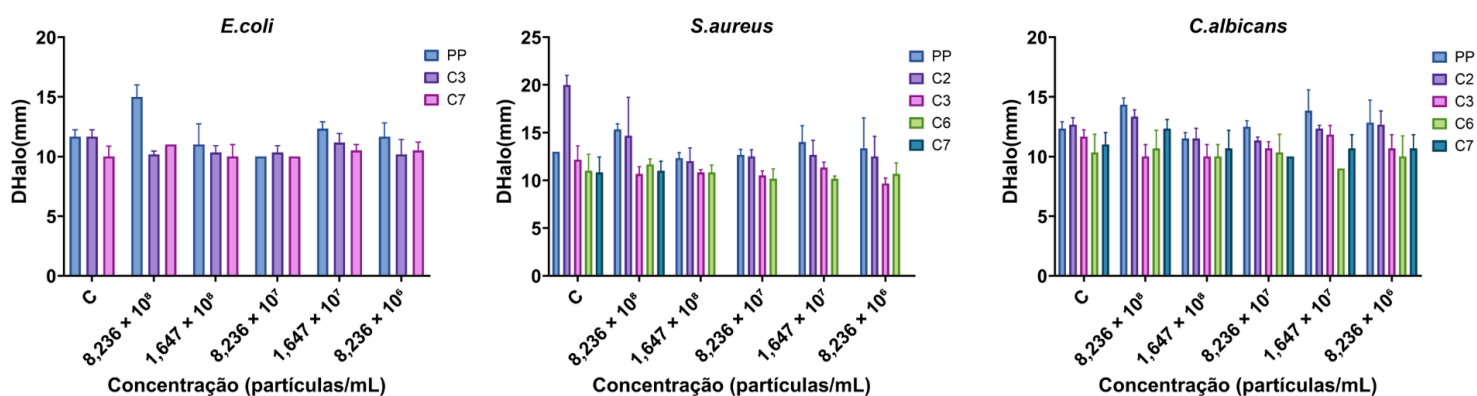


Figura 20: Gráficos da variação do diâmetro de halo para cada concentração de nanopartículas testada em adição aos cultivos PP, C2, C3, C6 e C7, contra os microrganismos *E.coli*, *S.aureus* e *C.albicans*. C= controle de cada cultivo sem adição de nanopartículas.

Em uma comparação mais detalhada entre os cultivos, vemos que nos testes contra a bactéria *E.coli*, o cultivo PP na adição de $8,236 \times 10^8$ partículas/mL obteve halos de inibição maiores que os cultivos C3 e C7.

Já contra a bactéria *S.aureus*, o halo de inibição (20 mm) observado no controle de C2, se destaca com relação aos outros cultivos, incluindo o cultivo PP, porém, para os cultivos com adição de nanopartículas, o cultivo PP na adição nas concentrações $8,236 \times 10^8$; $1,647 \times 10^8$; $8,236 \times 10^7$ e $1,647 \times 10^7$ partículas/mL, se mostrou melhor que os cultivos C3 e C6, na concentração $8,236 \times 10^8$ partículas/mL, foi superior também aos resultados observados para o cultivo C7, levando em conta que as outras concentrações não puderam ser avaliadas para o cultivo C7, que não apresentou halos de inibição, enquanto para o cultivo C2, não houve diferença estatisticamente significativa.

Por fim, contra o fungo leveduriforme *C.albicans*, o cultivo PP na adição nas concentrações $8,236 \times 10^8$ e $1,647 \times 10^7$, apresentou melhores resultados em comparação com os cultivos C2, C3, C6 e C7.

Tais resultados podem ser melhor observados na figura 21. Na figura 22, podemos observar os halos de inibição obtidos no teste para cada cultivo testado.

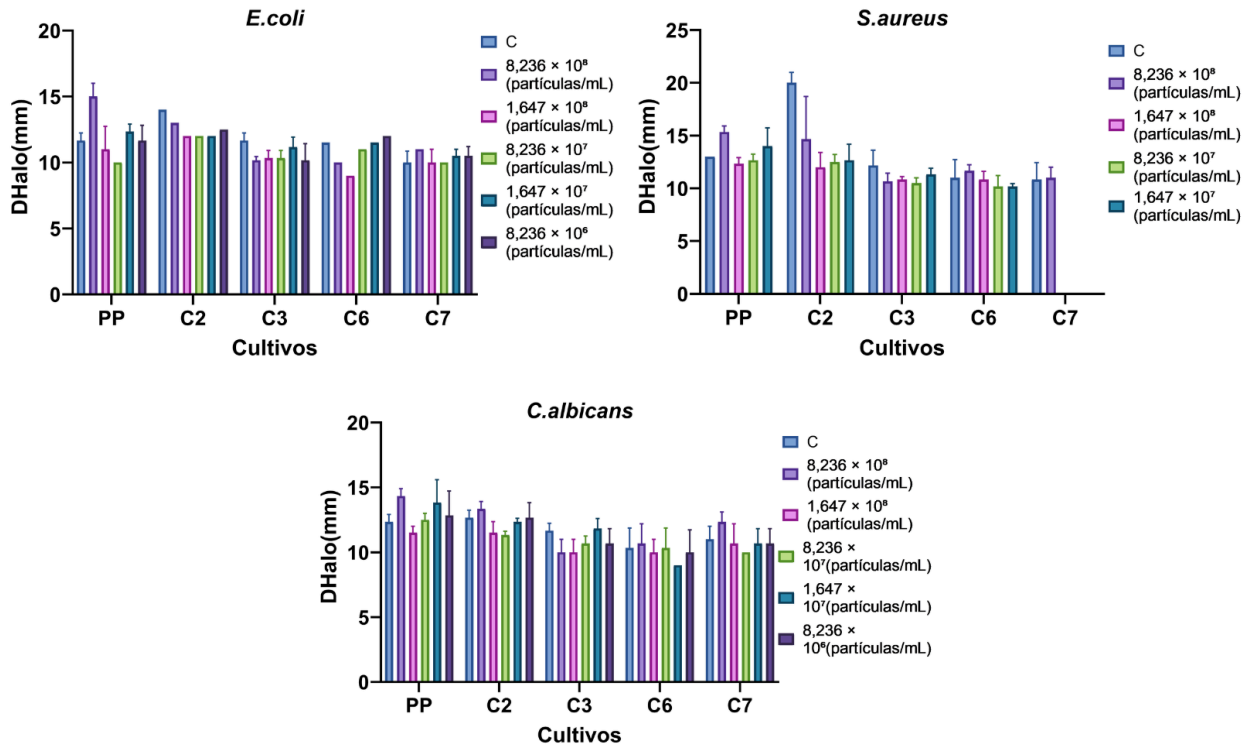


Figura 21: Gráficos da variação do diâmetro de halo para cada um dos cultivos testados PP, C2, C3, C6 e C7, em adição das concentrações $8,236 \times 10^8$; $1,647 \times 10^8$; $8,236 \times 10^7$, $1,647 \times 10^7$ e $8,236 \times 10^6$ partículas/mL de nanopartículas, testados contra os microrganismos *E. coli*, *S. aureus* e *C. albicans*. C= controle de cada cultivo sem adição de nanopartículas.

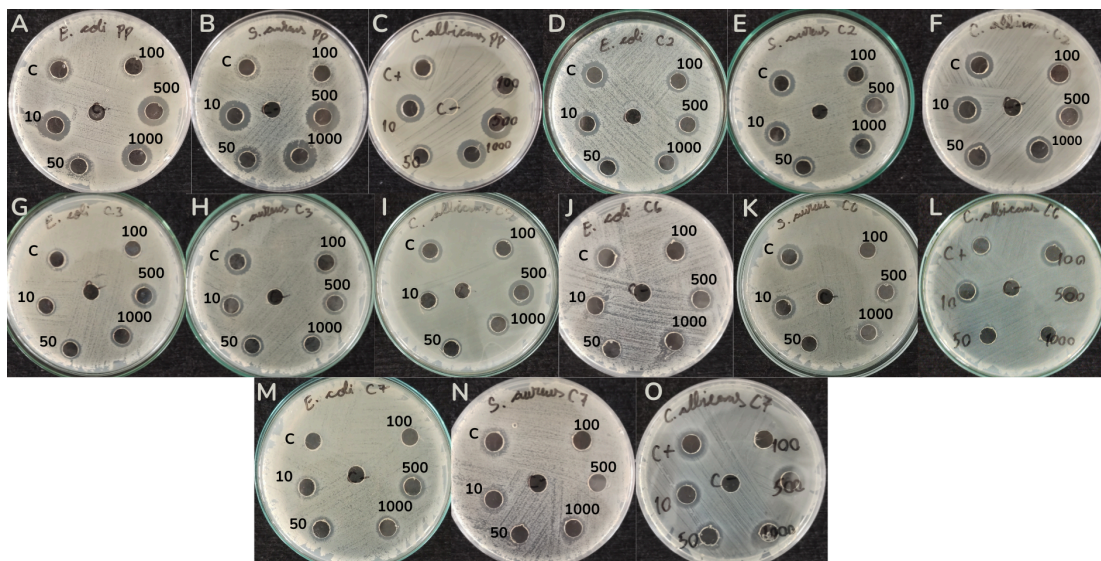


Figura 22: Halos de inibição indicando atividade antimicrobiana dos cultivos PP, C2, C3, C6 e C7 em adição das concentrações $8,236 \times 10^8$ (10); $1,647 \times 10^8$ (50) ; $8,236 \times 10^7$ (100), $1,647 \times 10^7$ (500) e $8,236 \times 10^6$ (1000) partículas/mL de nanopartículas, e o controle sem a adição de nanopartículas, testados contra os microrganismos *E.coli*, *S.aureus* e *C.albicans*. Os valores 10, 50, 100, 500 e 1000, presentes nas placas simbolizam as diluições realizadas para obter as concentrações testadas. A = Cultivo PP testado contra *E.coli*. B = Cultivo PP testado contra *S.aureus*. C = Cultivo PP testado contra *C.albicans*. D = Cultivo C2 testado contra *E.coli*. E = Cultivo C2 testado contra *S.aureus*. F = Cultivo C2 testado contra *C.albicans*. G = Cultivo C3 testado contra *E.coli*. H = Cultivo C3 testado contra *S.aureus*. I = Cultivo C3 testado contra *C.albicans*. J = Cultivo C6 testado contra *E.coli*. K = Cultivo C6 testado contra *S.aureus*. L = Cultivo C6 testado contra *C.albicans*. M = Cultivo C7 testado contra *E.coli*. N = Cultivo C7 testado contra *S.aureus*. O = Cultivo C7 testado contra *C.albicans*.

Diante dos resultados obtidos, podemos observar que apenas a maior concentração de nanopartículas testadas, apresentou um aumento na atividade antimicrobiana ao ser adicionado em um dos cultivos testados, levantando a possibilidade de que resultados melhores possam ser atingidos ao testar maiores concentrações.

Resultados semelhantes foram observados no trabalho de Al-Theyab et al. (2023), em que foi estudado o efeito da intervenção de várias concentrações de nanopartículas de ouro (AuNPs) no cultivo de isolados bacterianos e o efeito dessa intervenção na biossíntese de metabólitos secundários, e a intensidade da biossíntese de dois metabólitos secundários monitorados, aumentou conforme o aumento da concentração de AuNPs testadas (AL-THEYAB et al., 2023).

Recente trabalho de Oliveira et al., (2025), demonstrou que a combinação de nanofibras, *P. polymyxa* e nanopartículas de prata aumentaram a atividade antimicrobiana. Outro estudo, apresentou a intervenção de nanopartículas na produção de metabólitos secundários, em que foi demonstrado que pequenas concentrações de nanopartículas de cobre aumentou a produção de actinorhodin (ACT), antibiótico produzido por *Streptomyces coelicolor*, e a presença de altas concentrações, inibem esse processo (LIU et al., 2019).

3.5 Análise dos efeitos dos caldos fermentados e nanopartículas de prata em linhagem celular humana (in vitro)

O metabolismo celular em porcentagem apresentou uma redução significativa quando as células foram expostas por 24 horas a todos os co-cultivos, mas com diferença significativa

em PP, C2, C3, C6, PT(N), BT(N) e PP com adição de $8,236 \times 10^8$ partículas/mL. Esses resultados sugerem fortemente uma citotoxicidade associada a esses tratamentos, evidenciando que a presença dos co-cultivos compromete a capacidade das células de manter o funcionamento metabólico ideal.

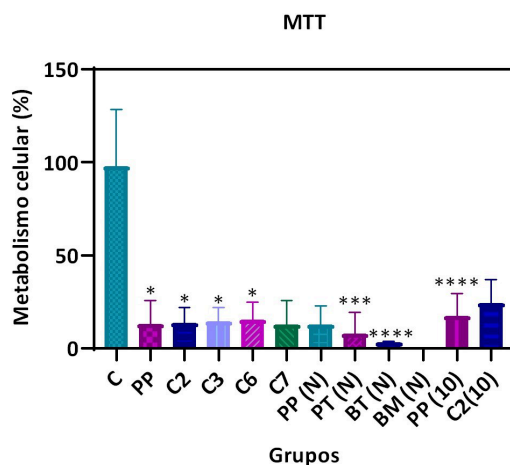


Figura 23: Ensaios de citotoxicidade em fibroblastos. Metabolismo celular (%) pelo ensaio com MTT. Células HDFn após 24 horas de exposição aos cultivos, co-cultivos e nanopartículas PP, C2, C3, C6, C7, PP(N), PT(N), BT(N), BM(N) e PP(10) e suas diluições. (*) vs C-; * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$; **** $p \leq 0,0001$.

Em estudo de Neris et al. (2017), em que o extrato liofilizado total (ELT) de *Paenibacillus polymyxa* foi testado quanto a sua citotoxicidade em fibroblastos (BALB/3T3), a concentração de 1 mg/mL ($1000 \mu\text{g/mL}^{-1}$) afetou significativamente a cinética de crescimento em todos os períodos testados, sendo que após 24h o extrato induziu apoptose e necrose, também foi observado que essa citotoxicidade acontecia de forma dependente da dose (NERIS et al., 2017).

Já as nanopartículas de prata também demonstraram citotoxicidade dependendo da dose e tempo de exposição, não sendo citotóxicas em concentrações abaixo de $10 \mu\text{g/mL}$, durante a exposição de curto prazo em células de fibroblasto (CORRÊA et al., 2015).

No presente estudo, a menor concentração testada com relação aos cultivos, equivalente a menor concentração inibitória encontrada anteriormente ($1500 \mu\text{g/mL}^{-1}$), apresentou citotoxicidade quando exposta a células de fibroblasto por 24h, estando em concordância com o trabalho apresentado anteriormente, em que mesmo na concentração de $1000 \mu\text{g/mL}^{-1}$, o extrato da bactéria *Paenibacillus polymyxa*, induziu necrose e apoptose. O

mesmo pode ser observado para as nanopartículas testadas. Porém, a citotoxicidade é dependente da concentração e tempo de exposição, de tal forma, uma otimização do processo, pode vir a reduzir essa citotoxicidade.

4. Conclusão

De acordo com os resultados obtidos, podemos concluir que os co-cultivos de *Paenibacillus polymyxa* com *Bacillus thuringiensis* (C2), *Paenibacillus polymyxa* com *Bacillus megaterium* (C3), *Paenibacillus polymyxa*, *Paenibacillus terrae* e *Bacillus thuringiensis* (C6), *Paenibacillus polymyxa*, *Paenibacillus terrae* e *Bacillus megaterium* (C7) apresentaram atividade antimicrobiana significativa em menores concentrações em comparação com os cultivos simples. Os co-cultivos não foram capazes de sintetizar nanopartículas de prata, enquanto os cultivos simples apresentaram essa capacidade, sendo que todas as nanopartículas produzidas apresentaram atividade antimicrobiana contra os três microrganismos testados. Já a adição de pequenas quantidades de nanopartículas como estimulantes abióticos no processo de fermentação, apresentou um aumento significativo na atividade antimicrobiana do cultivo simples de *Paenibacillus polymyxa*. Apesar dos resultados significativos acerca da atividade antimicrobiana, os cultivos testados apresentaram atividade citotóxica quando em contato com células de fibroblasto humanas, indicando a necessidade de otimização dos processos na tentativa de reduzir essa citotoxicidade para possíveis usos clínicos e farmacológicos.

5. Referências Bibliográficas

ABDELHAMID, A. G. et al. Efficient Production of Broad-Spectrum Antimicrobials by *Paenibacillus polymyxa* OSY–EC Using Acid Whey-Based Medium and Novel Antimicrobial Concentration Approach. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 10, 13 maio 2022.

ABD EL-RAHEEM, R. E. S. et al. Biomimetic Synthesis of Silver Nanoparticles Using New Aquatic Species of *Bacillus*, *Alcaligenes*, and *Paenibacillus* and their Potential Antibiofilm Activity against Biofilm-Forming *Escherichia coli*. **Letters in Applied NanoBioScience**, v. 12, n. 4, p. 127, 18 set. 2022.

AHMADI, S. Antibacterial and antifungal activities of medicinal plant species and endophytes. **Cellular, Molecular and Biomedical Reports**, v. 2, n. 2, p. 109–115, 1 jun. 2022.

AL-ASBAHI, M. G. S. S. et al. Silver nanoparticles biosynthesis using mixture of *Lactobacillus* sp. and *Bacillus* sp. growth and their antibacterial activity. **Scientific Reports**, v. 14, n. 1, p. 10224, 3 maio 2024.

ALFRYYAN, N. et al. Characterization of the biosynthesized intracellular and extracellular plasmonic silver nanoparticles using *Bacillus cereus* and their catalytic reduction of methylene blue. **Scientific Reports**, v. 12, n. 1, 21 jul. 2022.

AL-THEYAB, N. et al. Draft genome sequence of potato crop bacterial isolates and nanoparticles-intervention for the induction of secondary metabolites biosynthesis. **Saudi Pharmaceutical Journal**, v. 31, n. 6, p. 783–794, 23 abr. 2023.

AL-THUBIANI, A. S. A. et al. Identification and characterization of a novel antimicrobial peptide compound produced by *Bacillus megaterium* strain isolated from oral microflora. **Saudi Pharmaceutical Journal** : SPJ, v. 26, n. 8, p. 1089–1097, 1 dez. 2018.

ANANDAN, K.; VITTAL, R. R. Endophytic *Paenibacillus amylolyticus* KMCLE06 Extracted Dipicolinic Acid as Antibacterial Agent Derived via Dipicolinic Acid Synthetase Gene. **Current Microbiology**, v. 76, n. 2, p. 178–186, 29 nov. 2018.

ANTIMICROBIAL RESISTANCE COLLABORATORS. Global Burden of Bacterial Antimicrobial Resistance in 2019: A Systematic Analysis. **The Lancet**, v. 399, n. 10325, p. 629–655, 12 fev. 2022.

BAHAR ONARAN ACAR; ERMAN GÜLENDAG. Comparison of Antimicrobial Activities of Ethanol- and Water-Based Propolis Extracts on Various Foodborne Pathogens by Agar-Well Diffusion Method. Deleted Journal, v. 54, n. 3, p. 130–136, 14 set. 2023.

BARBOSA , L. C.; SOUSA , C. P. de. Bioprospecção da atividade antimicrobiana do caldo de fermentação produzido pelo endofítico *Paenibacillus terrae* em co-cultivo com *Bacillus thuringiensis* e *Bacillus megaterium*. **Seven Editora**, 2023.

BOGAS, A. C.; CRUZ, F. P. N.; LACAVALA, P. T.; SOUSA, C. P. Endophytic fungi: an overview on biotechnological and agronomic potential. **BRAZILIAN JOURNAL OF BIOLOGY (ONLINE)**, v. 84, p. e258557, 2024.

BOGAS, A. C. ; RODRIGUES, S. H. ; GONCALVES, M. O. ; ASSIS, M. ; LONGO, E. ; PAIVA DE SOUSA, C. Endophytic microorganisms from the tropics as biofactories for the synthesis of metal-based nanoparticles: Healthcare applications. **Frontiers in Nanotechnology**, v. 1, p. 104522, 2022.

BONA, E. A. M. D. et al. Comparação de métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração inibitória mínima (cim) de extratos vegetais aquosos e etanólicos. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 81, n. 3, p. 218–225, jul. 2014.

CAHAN, R.; FRIMAN, H.; NITZAN, Y. Antibacterial activity of Cyt1Aa from *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. **Microbiology**, v. 154, n. 11, p. 3529–3536, 1 nov. 2008.

CARDOSO, J. C.; OLIVEIRA, M. E. B. DE; CARDOSO, F. DE C. Advances and challenges on the in vitro production of secondary metabolites from medicinal plants. **Horticultura Brasileira**, v. 37, n. 2, p. 124–132, 1 jun. 2019.

CARVALHO, Carina Miranda. Biossíntese de nanopartículas de ouro por *Paenibacillus polymyxa* e *Paenibacillus terrae*. 2020. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2020. Disponível em: <https://repositorio.ufscar.br/handle/20.500.14289/13430>.

CAVICCHIOLI, R. Bioprospecção de novos isolados e avaliação do potencial antimicrobiano, leishmanicida, antitumoral e perfil citotóxico dos cultivos puros e mistos de *Paenibacillus polymyxa*. 2021. Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2021. Disponível em: <https://repositorio.ufscar.br/handle/20.500.14289/15644>.

CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved Standard—Eleventh Edition. **CLSI document M02-A11**. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2012.

COCHRANE, S. A.; VEDERAS, J. C. Lipopeptides from *Bacillus* and *Paenibacillus* spp.: A Gold Mine of Antibiotic Candidates. **Medicinal Research Reviews**, v. 36, n. 1, p. 4–31, 28 maio 2014.

CORRÊA, J. M. et al. Silver Nanoparticles in Dental Biomaterials. **International Journal of Biomaterials**, v. 2015, p. 1–9, 2015.

CORRÊA, J. S. et al. Antimicrobial resistance in Brazil: an integrated research agenda. **Revista da Escola de Enfermagem da USP**, v. 56, 2022.

CUI, L. et al. Potential of an endophytic bacteria *Bacillus amyrololiquefaciens* 3–5 as biocontrol agent against potato scab. **Microbial Pathogenesis**, v. 163, p. 105382, fev. 2022.

DE QUEIROZ, J. C. E.; LEITE, J. R. S. A.; VASCONCELOS, A. G. Prospecting Plant Extracts and Bioactive Molecules with Antimicrobial Activity in Brazilian Biomes: A Review. **Antibiotics (Basel, Switzerland)**, v. 12, n. 3, p. 427, 21 fev. 2023.

DIGRA, S.; NONZOM, S. An insight into endophytic antimicrobial compounds: an updated analysis. **Plant Biotechnology Reports**, 14 mar. 2023.

FERREIRA, M. et al. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE EXTRATO, FRAÇÕES E ÓLEO ESSENCIAL DA *P. obliquum* RUIZ E PAVON – ESEC CUNIÃ, PORTO VELHO, RONDÔNIA. **South American Journal of Basic Education, Technical and Technological**, v. 6, n. 1, 1 ago. 2019.

GAO, C.-H. et al. The initial inoculation ratio regulates bacterial coculture interactions and metabolic capacity. **The ISME Journal**, v. 15, n. 1, p. 29–40, 1 jan. 2021.

GASPAR, E. B. et al. Comparação de Métodos para a Avaliação in Vitro de Atividade Antimicrobiana de Extratos Vegetais. **Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, Embrapa Pecuária Sul Bagé, RS**, v. 40, n. 1, p. 4-23, 2017.

GEA, T. et al. Effect of the addition of the *Bacillus* sp., *Paenibacillus* sp. bacterial strains on the co-composting of green and food waste, 1 abr. 2022.

GEVORGYAN, S. et al. Structural characterization and antibacterial activity of silver nanoparticles synthesized using a low-molecular-weight Royal Jelly extract. **Scientific Reports**, v. 12, n. 1, p. 14077, 18 ago. 2022.

HOSSAIN, T. J. Methods for screening and evaluation of antimicrobial activity: A review of protocols, advantages, and limitations. **European journal of microbiology & immunology**, v. 14, n. 2, 22 abr. 2024.

JHA, S. (Ed.). Endophytes and Secondary Metabolites. **Reference Series in Phytochemistry**. 2019.

- JONES, J. A.; WANG, X. Use of bacterial co-cultures for the efficient production of chemicals. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 53, p. 33–38, out. 2018.
- KALANGADAN, N. et al. Characterization and antimicrobial evaluation of green synthesized silver nanoparticle thin films with reusable applications. **Materials Letters**, v. 314, p. 131923, maio 2022.
- KATZ, L.; BALTZ, R. H. Natural product discovery: past, present, and future. **Journal of industrial microbiology & biotechnology**, v. 43, n. 2-3, p. 155–76, 2016.
- KLAUS, J. R. et al. *Burkholderia thailandensis* Methylated Hydroxyalkylquinolines: Biosynthesis and Antimicrobial Activity in Cocultures. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 86, n. 24, 24 nov. 2020.
- KRISTINA V. T. et al. Biological activity of silver nanoparticles synthesized with *Paenibacillus polymyxa* exopolysaccharides, **Enzyme and Microbial Technology**, v. 164, 2023.
- LIMA, A. K. O. et al. Green Synthesis of Silver Nanoparticles Using *Paullinia cupana Kunth* Leaf Extract Collected in Different Seasons: Biological Studies and Catalytic Properties. **Pharmaceutics**, v. 17, n. 3, p. 356, 10 mar. 2025.
- LIU, X. et al. Mechanism of CuO nano-particles on stimulating production of actinorhodin in *Streptomyces coelicolor* by transcriptional analysis. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 1–10, 2 ago. 2019.
- LODI, R. S. et al. Antimicrobial activity and enzymatic analysis of endophytes isolated from *Codonopsis pilosula*. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 99, n. 8, 26 jun. 2023.
- MARTÍNEZ-ZAVALA, S. A. et al. Chitinases of *Bacillus thuringiensis*: Phylogeny, Modular Structure, and Applied Potentials. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, 14 jan. 2020.
- MONIKA et al. Endophytic bacteria as a source of bioactive compounds. **Elsevier eBooks**, p. 175–188, 1 jan. 2020.
- MOREIRA, C. C. et al. Leishmanicidal, cytotoxic, antimicrobial and enzymatic activities of Diaporthe species, a mangrove-isolated endophytic fungus. **African Journal of Microbiology Research**, v. 14, p. 516-524, 2020.

NADAF, N. Y.; KANASE, S. S. Biosynthesis of gold nanoparticles by *Bacillus marisflavi* and its potential in catalytic dye degradation. **Arabian Journal of Chemistry**, v. 12, n. 8, p. 4806–4814, dez. 2019.

NATARAJAN, M. et al. Bioactive exopolysaccharide from endophytic *Bacillus thuringiensis* SMJR inhibits food borne pathogens and enhances the shelf life of foods. **Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre**, v. 27, p. 100297, maio 2022.

NERIS, D. M. et al. Cytotoxic Effects and Production of Cytokines Induced by the Endophytic *Paenibacillus polymyxa* RNC-D In Vitro. **Current Pharmaceutical Biotechnology**, v. 18, n. 9, 29 dez. 2017.

NGUYEN HUY THUAN et al. Recent advances in microbial co-culture for production of value-added compounds. **3 Biotech**, v. 12, n. 5, 19 abr. 2022.

OLISHEVSKA, S.; NICKZAD, A.; DÉZIEL, E. *Bacillus* and *Paenibacillus* secreted polyketides and peptides involved in controlling human and plant pathogens. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 103, n. 3, p. 1189–1215, 3 jan. 2019.

OLIVEIRA, L. F. R. et al. Combining Electrospun Nanofibers, *Paenibacillus polymyxa* Fermented Broth and Silver Nanoparticles for Enhanced Antimicrobial Materials. **Bionanoscience**, v. 15, p. 356, 2025.

OLIVEIRA-SANTOS, N. et al. More than just an insect killer: The non-insecticidal activities of *Bacillus thuringiensis* with biotechnological potential. **Toxicon**, v. 233, p. 107261, 1 set. 2023.

PANDIAN, K. et al. Anaerobic mixed consortium (AMC) mediated enhanced biosynthesis of silver nano particles (AgNPs) and its application for the removal of phenol. **Journal of hazardous materials**, v. 416, p. 125717–125717, 1 ago. 2021.

PARAJE, M. G. From the magic bullet to nanotechnology: nanoantimicrobials as therapeutics to fight multidrug-resistant microorganisms. **Revista Argentina de Microbiología**, v. 55, n. 3, p. 204–205, 1 jul. 2023.

PATEL, S.; GUPTA, R. S. A phylogenomic and comparative genomic framework for resolving the polyphyly of the genus *Bacillus*: Proposal for six new genera of *Bacillus*

species, *Peribacillus* gen. nov., *Cytobacillus* gen. nov., *Mesobacillus* gen. nov., *Neobacillus* gen. nov., *Metabacillus* gen. nov. and *Alkalihalobacillus* gen. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 70, n. 1, 16 out. 2019.

PATOWARY, R.; DEKA, H. *Paenibacillus*. **Beneficial Microbes in Agro-Ecology**, p. 339–361, 2020.

PENG, X.-Y. et al. Co-culture: stimulate the metabolic potential and explore the molecular diversity of natural products from microorganisms. **Marine Life Science & Technology**, 4 jan. 2021.

RAIMI, A.; ADELEKE, R. Bioprospecting of endophytic microorganisms for bioactive compounds of therapeutic importance. **Archives of Microbiology**, v. 203, n. 5, p. 1917–1942, 7 mar. 2021.

ROMANO, L. H. Bioprospecção de microrganismos endofíticos isolados de *Tabebuia* spp. e *Hymenaea courbaril* e identificação da produção de metabólitos de interesse biotecnológico. 2014. 136 f. Tese (Doutorado em Multidisciplinar) - Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2014.

RUDRAMURTHY, G. R. et al. Nanoparticles: Alternatives Against Drug-Resistant Pathogenic Microbes. **Molecules**, v. 21, n. 7, p. 836, 1 jul. 2016.

SANTOS-MIRANDA, A. Para Onde Vamos com os Produtos Naturais? Explorando o Verdadeiro Potencial de Novos Medicamentos Derivados de Plantas no Campo Cardiovascular. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 119, n. 2, p. 305–306, 2022.

SARAVANAN, H. et al. Exploring nanocomposites for controlling infectious microorganisms: charting the path forward in antimicrobial strategies. **Frontiers in Pharmacology**, v. 14, p. 1282073, 2023.

SREENIVASA, N. et al. Biogenic synthesis of silver nanoparticles using *Paenibacillus* sp. in-vitro and their antibacterial, anticancer activity assessment against human colon tumour cell line. **Journal of Environmental Biology**, v. 42, n. 1, p. 118–127, 30 jan. 2021.

SELVARAJ, S.; AMARAL J. M.; V. RAMACHANDRA MURTY. Kinetics and antimicrobial activity of gallic acid by novel bacterial co-culture system using Taguchi's method and submerged fermentation. **Archives of Microbiology**, v. 204, n. 9, 1 set. 2022.

SERRANO, N. F. G. et al. Purification and characterization of two new antimicrobial molecules produced by an endophytic strain of *Paenibacillus polymyxa*. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 93, n. 3, p. e20200486, 2021.

SILVA, I. DOS A.; ALVIM, H. G. DE O. A HISTÓRIA DOS MEDICAMENTOS E O USO DAS FÓRMULAS: A CONSCIENTIZAÇÃO DO USO ADEQUADO. **Revista JRG de Estudos Acadêmicos**, v. 3, n. 7, p. 475–488, 16 nov. 2020.

SINGH, S. et al. Extracellular facile biosynthesis, characterization and stability of gold nanoparticles by *Bacillus licheniformis*. **Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology**, v. 42, n. 1, p. 6–12, 26 fev. 2013.

SRINATH, B. S.; NAMRATHA, K.; BYRAPPA, K. Eco-Friendly Synthesis of Gold Nanoparticles by *Bacillus subtilis* and Their Environmental Applications. **Advanced Science Letters**, v. 24, n. 8, p. 5942–5946, 1 ago. 2018.

STANCU, M. M. Silver nanoparticles biosynthesised by using *Bacillus megaterium* IBBPo17. **Advances in Natural Sciences: Nanoscience and Nanotechnology**, 2021.

STIRK, W. A.; VAN STADEN, J. Bioprospecting for bioactive compounds in microalgae: Antimicrobial compounds. **Biotechnology Advances**, v. 59, p. 107977, out. 2022.

SUNG, A.; GROMEK, S.; BALUNAS, M. Upregulation and Identification of Antibiotic Activity of a Marine-Derived *Streptomyces* sp. via Co-Cultures with Human Pathogens. **Marine Drugs**, v. 15, n. 8, p. 250, 11 ago. 2017.

TEMKIN, M. I. et al. High Throughput Co-culture Assays for the Investigation of Microbial Interactions. **Journal of Visualized Experiments**, n. 152, 15 out. 2019.

TREGUBOVA, K. V. et al. Biological activity of silver nanoparticles synthesized with *Paenibacillus polymyxa* exopolysaccharides. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 164, p. 110174, 8 dez. 2022.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Antimicrobial Resistance. 2023. Disponível em: <<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/antimicrobial-resistance>> Acesso em: 03 out 2024.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. WHO fungal priority pathogens list to guide research, development and public health action. **World Health Organization**, 2022. Disponível em: <<https://iris.who.int/bitstream/handle/10665/363682/9789240060241-eng.pdf?sequence=1>> Acesso em: 08 jun 2025.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Global Antimicrobial Resistance and Use Surveillance System (GLASS) Report 2022. 2022. Disponível em: <<https://iris.who.int/bitstream/handle/10665/364996/9789240062702-eng.pdf?sequence=1>> Acesso em: 13 out 2024.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. WHO publishes list of bacteria for which new antibiotics are urgently needed. 2017. Disponível em: <<https://www.who.int/news/item/27-02-2017-who-publishes-list-of-bacteria-for-which-new-antibiotics-are-urgently-needed>> Acesso em: 03 out. 2024.

XIE, Y. et al. Isolation and Identification of Antibacterial Bioactive Compounds From *Bacillus megaterium* L2. **Frontiers in Microbiology**, v. 12, 24 mar. 2021.

YE, H.-T. et al. Endophytic fungi stimulate the concentration of medicinal secondary metabolites in *Houttuynia cordata thunb.* **Plant Signaling & Behavior**, v. 16, n. 9, p. 1929731, 6 jun. 2021.