



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



Bioprospecção de novos isolados e Avaliação do potencial antimicrobiano, leishmanicida, antitumoral e perfil citotóxico dos cultivos puros e mistos de *Paenibacillus polymyxa*

Rafael Cavicchioli

Tese do Exame Geral de Defesa de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal de São Carlos.

Orientadora:

Profa. Dra. Cristina Paiva de Sousa

* Bolsista CAPES, - 88882.426500/2019-01

**São Carlos - SP
2021**

Rafael Cavicchioli

Bioprospecção de novos isolados e Avaliação do potencial antimicrobiano, leishmanicida, antitumoral e perfil citotóxico dos cultivos puros e mistos de *Paenibacillus polymyxa*

Tese do Exame de Defesa apresentada ao Programa de Doutorado em Biotecnologia do Programa de Pós Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal de São Carlos.

Orientadora:

Profa. Dr. Cristina Paiva de Sousa

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Cristina Paiva de Sousa
Universidade Federal de São Carlos

Prof. Dr. Paulo Teixeira Lacava
Universidade Federal de São Carlos

Dra. Patrícia Brassolati
Universidade Federal de São Carlos

Prof. Dr. Adriano Evandir Marchello
Unisagrado/ Universidade Estadual Paulista

Prof. Dr. José Dirceu Vollet Filho
Universidade de São Paulo

São Carlos
2021



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

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

Folha de Aprovação

Defesa de Tese de Doutorado do candidato Rafael Cavicchioli, realizada em 20/08/2021.

Comissão Julgadora:

Profa. Dra. Cristina Paiva de Sousa (UFSCar)

Prof. Dr. Paulo Teixeira Lacava (UFSCar)

Profa. Dra. Patricia Brassolatti (UFSCar)

Prof. Dr. José Dirceu Vollet Filho (IFSC/USP)

Prof. Dr. Adriano Evandir Marchello (Êxito)

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

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

Que nossas filosofias sigam no mesmo passo de nossas tecnologias, que nossa compaixão siga no mesmo passo de nossos poderes. E que o amor, e não o medo, seja o motor da mudança. (Dan Brown – Origem).

"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"

PORTARIA Nº 206, DE 4 DE SETEMBRO DE 2018

CONSIDERANDO o constante dos autos do processo nº 23038.013648/2018-51, resolve:

Art. 1º Os trabalhos produzidos ou publicados, em qualquer mídia, que decorram de atividades financiadas, integral ou parcialmente, pela CAPES, deverão, obrigatoriamente, fazer referência ao apoio recebido.

Art. 2º Para fins de identificação da fonte de financiamento fica autorizada a utilização do código 001 para todos os financiamentos recebidos.

Art. 3º Deverão ser usadas as seguintes expressões, **no idioma do trabalho**:

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

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

Cavicchioli, Rafael. Avaliação do potencial antimicrobiano, leishmanicida e antitumoral de bactérias endofíticas isoladas de diferentes fontes vegetais em cultivos puros e mistos. 2021. Tese (Programa de Pós-graduação em Biotecnologia) – UFSCar, São Carlos, 2021.

Resumo

Endofíticos em geral encontram-se entre as fontes mais produtivas de metabólitos secundários, apresentando uma série de atividades biológicas e aplicações. Estima-se que aproximadamente metade dos antibióticos produzidos industrialmente, além de outros diversos compostos sejam produzidos por esses organismos. Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS) 90% das linhagens bacterianas são resistentes a drogas de primeira escolha. Portanto, a busca por novas moléculas com atividade antimicrobiana é urgente. Em vista disso, o presente estudo buscou otimizar condições de cultivo para a produção do caldo fermentado visando atingir a maior quantidade e diversidade de metabólitos secundários com ação biológica. Foram testados diferentes tipos de cultivos (axênicos e mistos), com a finalidade de avaliar a eficácia dos mesmos em relação à: atividade antimicrobiana, atividade leishmanicida, atividade antitumoral e citotoxicidade. Com base nos dados obtidos foi estabelecido um tempo de 168 horas para a produção dos caldos. O cultivo misto demonstrou maior atividade que o cultivo axênico em relação a atividade antimicrobiana, estabelecendo 95,86% de inibição em sua menor concentração testada para *P. aeruginosa*, 92,86% de inibição contra cepas de *E.coli*, 91,13% contra cepas de *Salmonella*. Utilizando a concentração de 2500 µg, obteve-se uma inibição de 82,5% em *S. aureus* e de 86% em *S. epidermidis*. Se tratando da atividade leishmanicida o caldo de cultivo misto demonstrou uma maior ação do que o de cultivo simples quando analisado em menores concentrações. Os testes de citotoxicidade demonstram uma serem tóxicos apenas a partir da concentração de 10000 µg. A partir desses resultados podemos concluir que os cultivos mistos apresentam grande potencial biológico, em concentrações não tóxicas.

A resistência a múltiplas drogas ocorre em bactérias GRAM-positivas e Gram-negativas, que causam infecções das quais não podem ser tratadas com a maioria dos antibióticos convencionais. Devido a esses e outros fatores a resistência microbiana é considerado um problema de saúde pública alarmante mostrando um número crescente de infecções causadas por bactérias

resistentes, que causam infecções em hospitais e comunidades. Quando algum tipo de infecção já não pode ser tratado por antibióticos de primeira linha, geralmente medicamentos mais caros devem ser selecionados para o tratamento. A duração maior da doença e do tratamento em questão, muitas vezes nos próprios hospitais, aumenta os custos com cuidados de saúde. Um relatório citando as principais ameaças à resistência a antibióticos, do CDC nos Estados Unidos (Relatório de ameaças à Resistência a Antibióticos de 2019), incluem as mais recentes estimativas nacionais de mortes e infecções que destacam a ameaça contínua de resistência a antibióticos. De acordo com o relatório, mais de 2,8 milhões de infecções resistentes a antibióticos ocorrem nos EUA a cada ano, e mais de 35.000 pessoas morrem como resultado. Com base nesses e em outros dados, a segunda parte do estudo tem como objetivo encontrar cepas com atividade antimicrobiana oriundas das espécies vegetais *Coffea arabica* e *Xylopiia aromatica* e seleciona 6 cepas que apresentam grande potencial biotecnológico. Estas cepas foram isoladas em estudos posteriores e apresentaram atividade antimicrobiana considerável.

Palavras Chave: Endofíticos; Atividade biológica; Citotoxicidade.

Abstract

Endophytes in general are among the most productive sources of secondary metabolites, presenting a series of biological activities and applications. It is estimated that approximately half of the antibiotics produced industrially, in addition to several other compounds, are produced by these organisms. According to the World Health Organization (WHO) 90% of bacterial strains are resistant to first-choice drugs. Therefore, the search for new molecules with antimicrobial activity is urgent. In view of this, the present study sought to optimize cultivation conditions for the production of fermented broth in order to achieve the greatest amount and diversity of secondary metabolites with biological action. Different types of cultures (axenic and mixed) were tested in order to evaluate their effectiveness in relation to: antimicrobial activity, leishmanicidal activity, antitumor activity and cytotoxicity. Based on the data obtained, a time of 168 hours was established for the production of broths. The mixed culture showed greater activity than the axenic culture in relation to antimicrobial activity, establishing 95.86% of inhibition at its lowest concentration tested for *P. aeruginosa*, 92.86% of inhibition against *E.coli* strains, 91.13% against *Salmonella setubal*. Using a concentration of 2500 µg, an inhibition of 82.5% was obtained in *S. aureus* and 86% in *S. epidermidis*. Regarding the leishmanicidal activity, the mixed culture broth showed a greater action than the simple culture when analyzed at lower concentrations. Cytotoxicity tests demonstrate that they are toxic only from a concentration of 10000 µg. From these results we can conclude that mixed cultures have great biological potential, in non-toxic concentrations.

Multidrug resistance occurs in both Gram-positive and Gram-negative bacteria, which cause infections that cannot be treated with most conventional antibiotics. Due to these and other factors, microbial resistance is considered an alarming public health problem, showing an increasing number of infections caused by resistant bacteria, which cause infections in hospitals and communities. When some type of infection can no longer be treated by first-line antibiotics, usually more expensive drugs must be selected for treatment. The longer duration of the illness and treatment in question, often in the hospitals themselves, increases health care costs. A report citing the top threats to antibiotic resistance from the CDC in the United States (2019 Antibiotic

Resistance Threats Report) includes the latest national estimates of deaths and infections that highlight the ongoing threat of antibiotic resistance. According to the report, more than 2.8 million antibiotic-resistant infections occur in the US each year, and more than 35,000 people die as a result. Based on these and other data, the second part of the study aims to find strains with antimicrobial activity from the plant species *Coffea arabica* and *Xylopia aromatica* and selects 6 strains that have great biotechnological potential. These strains were isolated in later studies and showed considerable antimicrobial activity.

Keywords: Endophytes; Biological activity; cytotoxicity.

Lista de Figuras

- Figura 1: Ciclo de vida da *Leishmania*. (Imagem de *Centers for Disease Control and Prevention Image Library*, adaptada). 31
- Figura 2: Cálculo para ajuste da concentração do pré-inoculo à 0,1 de absorbância. . 36
- Figura 3: Placa de 96 poços representativa do teste de Microdiluição. A coluna 1 em amarelo representa a adição de 100 µL do composto a ser testado, o qual foi submetido a diluição seriada como mostra as letras em cada poço da linha H; A coluna 12 em vermelho representa os poços de controle onde adicionou-se apenas 100 µL de meio MH e 20 µL da suspensão bacteriana..... 41
- Figura 4: Placa de 96 poços representativa do teste de Leishmania. A coluna 1 em verde representa a adição de 100 µL do composto a ser testado, o qual foi submetido a diluição seriada como mostra os números em cada poço da linha H; A coluna 12 em vermelho representa os poços de controle negativo onde adicionou-se apenas 100 µL de meio 199 e 100 µL da suspensão contendo cepas de Leishmania, nas linhas de A à D, sendo as demais linhas o branco do teste..... 44
- Figura 5: Ensaio de atividade antimicrobiana utilizando os caldos fermentados a partir de diferentes cultivos mistos. Cada poço representa um diferente tempo de fermentação do caldo. Onde: (1) 24 horas, (2) 48 horas, (3) 72 horas, (4) 96 horas, (5) 144 horas e (6) 168 horas. 49
- Figura 6: Atividade antimicrobiana dos três diferentes cultivos mistos frente as cepas testes previamente selecionadas, nos tempos de 24, 48, 72, 96, 120, 144 e 168 horas. (A) Cultivo misto obtido a partir da fermentação de *P. polymyxa* mais *S. aureus*; (B) Cultivo misto obtido a partir da fermentação de *P. polymyxa* mais *E. coli*; (C) Cultivo misto obtido a partir da fermentação de *P. polymyxa* mais *C. albicans*. 50
- Figura 7: Porcentagem de inibição do crescimento de *E.coli* nas concentrações de (20000, 10000, 5000, 2500 e 1250 µg/mL⁻¹) dos caldos fermentados obtidos por cultivos simples e mistos após liofilização. Onde: (A) Cultivo simples de *P. polymyxa*; (B) Cultivo misto de *P. polymyxa* com *S. aureus*; (C) Cultivo misto de *P. polymyxa* com *E. coli*; (D) Cultivo misto de *P. polymyxa* com *C. albicans*. As barras 1, 2 e 3 representam 3 diferentes experimentos..... 52
- Figura 8: Porcentagem de inibição do crescimento de *Pseudomonas aeruginosa* nas concentrações de (20000, 10000, 5000, 2500 e 1250 µg/mL⁻¹) dos caldos de fermentação obtidos por cultivos simples e mistos após liofilização. Onde: (A) Cultivo simples de *P. polymyxa*; (B) Cultivo misto de *P. polymyxa* com *S. aureus*; (C) Cultivo misto de *P. polymyxa* com *E. coli*; (D) Cultivo misto de *P. polymyxa* com *C. albicans*.53

Figura 9: Porcentagem de inibição do crescimento de <i>Salmonella setubal</i> nas concentrações de (20000, 10000, 5000, 2500 e 1250 $\mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$) dos caldos fermentados obtidos por cultivos simples e mistos após liofilização. Onde: (A) Cultivo simples de <i>P. polymyxa</i> ; ; (B) Cultivo misto de <i>P. polymyxa</i> com <i>S. aureus</i> ; (C) Cultivo misto de <i>P. polymyxa</i> com <i>E. coli</i> ; (D) Cultivo misto de <i>P. polymyxa</i> com <i>C. albicans</i>	57
Figura 10: Porcentagem de inibição do crescimento de <i>S. aureus</i> nas concentrações de (20000, 10000, 5000, 2500 e 1250 $\mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$) dos caldos fermentados obtidos por cultivos simples e mistos após liofilização. Onde: (A) Cultivo simples de <i>P. polymyxa</i> ; ; (B) Cultivo misto de <i>P. polymyxa</i> com <i>S. aureus</i> ; (C) Cultivo misto de <i>P. polymyxa</i> com <i>E. coli</i> ; (D) Cultivo misto de <i>P. polymyxa</i> com <i>C. albicans</i>	59
Figura 11: Porcentagem de inibição do crescimento de <i>S. epidermidis</i> nas concentrações de (20000, 10000, 5000, 2500 e 1250 $\mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$) dos caldos fermentados obtidos por cultivos simples e mistos após liofilização. Onde: (A) Cultivo simples de <i>P. polymyxa</i> ; ; (B) Cultivo misto de <i>P. polymyxa</i> com <i>S. aureus</i> ; (C) Cultivo misto de <i>P. polymyxa</i> com <i>E. coli</i> ; (D) Cultivo misto de <i>P. polymyxa</i> com <i>C. albicans</i>	60
Figura 12: Porcentagem de inibição do crescimento de <i>S. saprophyticus</i> nas concentrações de (20000, 10000, 5000, 2500 e 1250 $\mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$) dos caldos fermentados obtidos por cultivos simples e mistos após liofilização. Onde: (A) Cultivo simples de <i>P. polymyxa</i> ; ; (B) Cultivo misto de <i>P. polymyxa</i> com <i>S. aureus</i> ; (C) Cultivo misto de <i>P. polymyxa</i> com <i>E. coli</i> ; (D) Cultivo misto de <i>P. polymyxa</i> com <i>C. albicans</i>	61
Figura 13: Porcentagem de inibição do crescimento de <i>M. luteus</i> nas concentrações de (20000, 10000, 5000, 2500 e 1250 $\mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$) dos caldos fermentados obtidos por cultivos simples e mistos após liofilização. Onde: (A) Cultivo simples de <i>P. polymyxa</i> ; ; (B) Cultivo misto de <i>P. polymyxa</i> com <i>S. aureus</i> ; (C) Cultivo misto de <i>P. polymyxa</i> com <i>E. coli</i> ; (D) Cultivo misto de <i>P. polymyxa</i> com <i>C. albicans</i>	62
Figura 14: Porcentagem de inibição do crescimento de <i>Bacillus subtilis</i> nas concentrações de (20000, 10000, 5000, 2500 e 1250 $\mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$) dos caldos fermentados obtidos por cultivos simples e mistos após liofilização. Onde: (A) Cultivo simples de <i>P. polymyxa</i> ; ; (B) Cultivo misto de <i>P. polymyxa</i> com <i>S. aureus</i> ; (C) Cultivo misto de <i>P. polymyxa</i> com <i>E. coli</i> ; (D) Cultivo misto de <i>P. polymyxa</i> com <i>C. albicans</i>	63
Figura 15: Tempo de morte de cepas de <i>E. coli</i> frente ao tratamento com o caldo fermentado misto de <i>P. polymyxa</i> mais <i>S. aureus</i> . O valor da CIM utilizada foi de 1250 $\mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$ e para CBM foi de 2500 $\mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$	67
Figura 16: Tempo de morte de cepas de <i>P. aeruginosa</i> frente ao tratamento com o caldo fermentado misto de <i>P. polymyxa</i> mais <i>S. aureus</i> . O valor da CIM utilizada foi de 1250 $\mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$ e para CBM foi de 2500 $\mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$	67

Figura 17: Tempo de morte de cepas de <i>S. saprophyticus</i> frente ao tratamento com o caldo fermentado misto de <i>P. polymyxa</i> mais <i>C. albicans</i> . O valor da CIM utilizado foi de 2500 µg/mL ⁻¹ e para CBM foi de 10000 µg/mL ⁻¹	68
Figura 18: Mortalidade celular em diversas concentrações dos extratos obtidos do <i>P. polymyxa</i> contra os promastigotas de <i>L. infantum chagasi</i> . A) Extrato de <i>P. polymyxa</i> . B) Extrato obtido do cultivo misto <i>P. polymyxa</i> com <i>Staphylococcus aureus</i> . C) Extrato obtido do cultivo misto <i>P. polymyxa</i> com <i>Escherichia coli</i> . Os valores são expressos como média + D.P.	70
Figura 19: Viabilidade da linhagem HDFn frente ao caldo fermentado puro de <i>P. polymyxa</i> em diferentes concentrações, nos tempos de 24, 48 e 72 horas. Os valores são expressos como média + desvio padrão. * Significância estatística de $p \leq 0.05$...	73
Figura 20: Viabilidade da linhagem HDFn frente ao caldo fermentado misto de <i>P. polymyxa</i> mais <i>S. aureus</i> em diferentes concentrações, nos tempos de 24, 48 e 72 horas. Os valores são expressos como média + desvio padrão. * Significância estatística de $p \leq 0.05$	74
Figura 21: Viabilidade da linhagem HaCat frente ao caldo fermentado puro de <i>P. polymyxa</i> em diferentes concentrações, nos tempos de 24, 48 e 72 horas. Os valores são expressos como média + desvio padrão. * Significância estatística de $p \leq 0.05$...	75
Figura 22: Fotomicrografias representativas em diferentes tempos do cultivo celular para análise de migração celular da linhagem HDFn frente ao caldo fermentado de <i>P. polymyxa</i>	77
Figura 23: Fotomicrografias representativas em diferentes tempos do cultivo celular para análise de migração celular da linhagem HDFn frente ao caldo fermentado de <i>P. polymyxa</i> mais <i>S. aureus</i>	78
Figura 24: Fotomicrografias representativas em diferentes tempos do cultivo celular para análise de migração celular da linhagem HaCat frente ao caldo fermentado de <i>P. polymyxa</i>	79
Figura 25: Fotomicrografias representativas em diferentes tempos do cultivo celular para análise de migração celular da linhagem HaCat frente ao caldo fermentado de <i>P. polymyxa</i> mais <i>S. aureus</i>	80
Figura 26: Ação do caldo fermentado por <i>P. polymyxa</i> frente a linhagem celular C3a (hepatoma de fígado humano). Os valores representam a taxa de mortalidade celular nas diferentes concentrações do caldo nos tempos de 24, 48 e 72 horas. Os valores são expressos como média + desvio padrão. *Significância estatística de $p \leq 0.05$	82
Figura 27: Ação do caldo fermentado por <i>P. polymyxa</i> mais <i>S. aureus</i> frente a linhagem celular C3a (hepatoma de fígado humano). Os valores representam a taxa de mortalidade celular nas diferentes concentrações do caldo nos tempos de 24, 48 e 72	

horas. Os valores são expressos como média + desvio padrão. * Significância estatística de $p \leq 0.05$	83
Figura 28: Resultado de colônias bacterianas obtidas a partir do isolamento de folha, ramo, fruto e rizosfera.....	102
Figura 29: Médias da curva de cinética de crescimento das cepas pré-selecionadas em três diferentes meios de cultivo. A- Curva de crescimento <i>P. agglomerans</i> ; B- Curva de crescimento <i>P. dispersa</i> ; C- Curva de crescimento <i>E. asburiae</i> ; D- Curva de crescimento do endofítico nomeado como Ef2p4.....	107
Figura 30: Curva de cinética de crescimento das cepas pré-selecionadas em três diferentes meios de cultivo. A- Curva de crescimento Rizo07x; B- Curva de crescimento Rizo23c; C- Curva de crescimento Rizo11c.....	109

Lista de Tabelas

Tabela 1: Relação dos cultivos mistos realizados; Cepa endofítica mais cepa indicadora.	38
Tabela 2: Valores da CIM e da CBM para cada uma das cepas testadas neste estudo. A sigla PpSa foi utilizada para o caldo fermentado de <i>P. polymyxa</i> mais <i>S. aureus</i> , PpEc para <i>P. polymyxa</i> mais <i>E. coli</i> e PpCa para <i>P. polymyxa</i> mais <i>C. albicans</i>	66
Tabela 3: Quantidades e componentes presentes em cada um dos meios selecionados para este estudo. Valores expresso em (g/L).....	98
Tabela 4: Fonte de origem vegetal de onde cada microrganismo foi isolado e microrganismos que demonstraram melhor atividade.	98
Tabela 5: Avaliação qualitativa da atividade antimicrobiana de microrganismos endofíticos isolados de <i>X. aromatica</i> frente a microrganismos potencialmente patogênicos: <i>S. aureus</i> , <i>E. coli</i> , <i>C. albicans</i> . Ausência de atividade (-), presença de atividade antimicrobiana.	103
Tabela 6: Avaliação qualitativa da atividade antimicrobiana de microrganismos endofíticos isolados de <i>C. arabica</i> frente a microrganismos potencialmente patogênicos: <i>S. aureus</i> , <i>E. coli</i> , <i>C. albicans</i> . Ausência de atividade (-), presença de atividade antimicrobiana (+)	104

Sumário

1. INTRODUÇÃO	16
2. Objetivo Geral	20
1. CAPÍTULO 1: REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	21
1.1 <i>Paenibacillus polymyxa</i>	21
1.2 Cultivo Misto ou Cocultivo	22
1.3 Atividade Antimicrobiana	26
1.4 Atividade Leishmanicida	29
1.5 Citotoxicidade e Atividade antitumoral	32
2 OBJETIVOS	34
2.1 Objetivos específicos	34
3 METODOLOGIA	35
3.1 Cultivo simples	35
3.1.1 Cultivo simples de <i>Paenibacillus polymyxa</i>	35
3.1.2 Cultivo simples dos demais microrganismos utilizados como estimuladores ...	36
3.2 Cultivo Misto	37
3.2.1 Cultivo misto de bactérias endofíticas com microrganismos potencialmente patogênicos	37
3.2.2 Cultivo misto de bactérias endofíticas com fungos fitopatogênicos	38
3.3 Curva de Bioatividade	39
3.4 Ensaio de microdiluição	40
3.5 Determinação da concentração bactericida mínima	41
3.6 Curva de sobrevivência - <i>Time Kill test</i>	41
3.7 Atividade leishmanicida	42
3.8 Ensaio de citotoxicidade dos caldos fermentados	44
3.9 Migração celular	45
3.10 Ação antitumoral dos caldos fermentados	46
3.11 Análise estatística	46
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	48
4.1 Cultivo misto e avaliação antimicrobiana	48
4.2 Determinação da CIM e CBM	51
4.3 Tempo de morte – <i>Time kill test</i>	66
.....	67
4.4 Atividade Leishmanicida	69
4.5 Ensaio de Citotoxicidade	72

4.6	Migração celular	77
4.7	Citotoxicidade em HepG2/C3a hepatoma de fígado humano.....	82
5.	CONCLUSÃO.....	85
1.	CAPÍTULO 2: REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	87
1.1	Microorganismos endofíticos	87
1.2	Microorganismos rizosféricos	90
1.3	Microorganismos isolados do Cerrado	91
1.4	<i>Xylopi</i> <i>Aromática</i>	91
1.5	Microorganismos endofíticos isolados de <i>Coffea arabica</i>	93
2.	OBJETIVOS	94
2.1	Objetivos específicos	94
3.	METODOLOGIA.....	95
3.1	Isolamento Bacteriano	95
3.2	Triagem da atividade antimicrobiana – Teste do bloco de gelose.....	96
3.3	Padronização e produção do caldo fermentado.....	97
3.4	Curva de cinética bacteriana	100
3.5	Atividade antimicrobiana por difusão em ágar.....	100
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	102
4.1	Isolamento a partir de <i>Xylopi</i> <i>aromatica</i>	102
4.2	Triagem da atividade antimicrobiana	103
4.2.1	<i>Xylopi</i> <i>aromatica</i>	103
4.2.2	<i>Coffea arabica</i>	104
4.3	Padronização pela técnica de cinética de crescimento bacteriano e atividade antimicrobiana dos caldos fermentados.....	106
5.	CONCLUSÃO.....	111
	Referências	112

1. INTRODUÇÃO

A tese em questão foi dividida em dois capítulos para uma melhor compreensão do trabalho, onde inserido no Capítulo 1 está toda a parte do trabalho envolvendo cepas de *Paenibacillus polymyxa*. Já no Capítulo 2, foram abordados aspectos como a bioprospecção de microrganismos isolados de diferentes fontes vegetais. Todo o trabalho desenvolvido nessa tese visa a pesquisa e identificação de novos metabólitos ativos de origem bacteriana, assim como, a estimulação de tais microrganismos para aumento do potencial de ação desses metabólitos.

A indústria farmacêutica moderna é considerada uma das maravilhas do século XXI, uma ampla gama de drogas naturais e sintéticas, como Estreptomicina, Penicilina, Cefalosporinas e muitas outras, contribuíram amplamente no controle de doenças infecciosas. Esses produtos farmacêuticos considerados seguros e eficazes estenderam a vida útil média dos humanos nos últimos 50 anos (TRIPATHI et al., 2018). Atualmente, muitos pesquisadores defendem a opinião que a exploração de áreas biologicamente diversas, como ambientes marinhos, polares, desertos, ou ainda um bioma integrado de fatores, pode levar à identificação de novos produtos naturais ou estruturas químicas com bioatividade farmacêutica relevante (PYE et al., 2017; TRIPATHI et al., 2018).

Se tratando do cerrado, mais especificamente da área de cerrado contida dentro da Universidade Federal de São Carlos, pode-se citar diversos trabalhos nestas e em outras vertentes, já elaborados ou ainda em andamento (ASSIS, 2018; MACHADO., 2019; PIZA; HOKKA; SOUSA, 2015; SERRANO, 2014; TORRES, 2018). Muitas das ações apresentadas nesses estudos ocorrem graças a presença de metabólitos secundários com uma variedade de atividades farmacológicas significativa, podendo ser citado: proteção antioxidante, antitumoral, anti-inflamatória, antibacteriana e cardiovascular (GRAF; MILBURY; BLUMBERG, 2005).

Com a expansão do valor medicinal e da perspectiva do mercado, um número crescente de pesquisadores está tentando encontrar uma nova maneira

de produzir novos metabólitos a partir de extratos naturais, com ações biológicas em quantidades cada vez maiores. No entanto, como a produção metabólica de plantas é limitada pelo ambiente e pela especificidade espaço-temporal, é difícil melhorar o rendimento de metabólitos oriundos de espécies vegetais, diferentemente dos microrganismos, que se tornam uma fonte de exploração viável para determinado fim (ARISAWA; WATANABE, 2017).

Microrganismos endofíticos são definidos como fungos ou bactérias que colonizam o interior dos tecidos de plantas, sem apresentar efeito patogênico ao hospedeiro (ARAÚJO et al., 2008). Há numerosos estudos sugerindo que microrganismos endofíticos são ricas fontes na produção de metabólitos secundários (TANG et al., 2020). Uma ampla gama de antibióticos produzidos por endofíticos isolados de plantas medicinais demonstra o grande potencial de bioatividade contra bactérias, fungos e vírus. Esses metabólitos com potencial antimicrobiano, por sua vez exibem atividade em concentrações significativamente baixas, demonstrando um potencial antimicrobiano promissor e de amplo espectro dos metabólitos secundários obtidos a partir de endofíticos (GOLINSKA et al., 2015).

Para fornecer uma perspectiva sobre a questão da diversidade estrutural de produtos naturais PYE e colaboradores (PYE et al., 2017), realizaram uma série de análises sobre as estruturas de todos os produtos naturais de origem microbiana e marinha publicados durante o período de 1941 a 2015, fornecendo uma descrição do estado atual em que se encontra a pesquisa de produtos naturais e sua capacidade de produzir potencialmente novas classes de agentes terapêuticos no futuro. Em estudo, (DAVID; WOLFENDER; DIAS, 2015), constatam que o número de compostos publicados continuou a aumentar ou permanecer estável nas últimas duas décadas. Essa produtividade contínua pode refletir a crescente globalização da pesquisa de produtos naturais, com a maioria dos países que possuem infraestrutura acadêmica significativa para este tipo de pesquisa. Por exemplo, houve um aumento considerável na produtividade nas pesquisas de produtos naturais da China, Coreia, Brasil e Índia durante esse período (ABBAS et al., 2011). De uma perspectiva global, os números indicam que ainda há um foco saudável na pesquisa de produtos naturais. Além disso, a robusta produtividade desses esforços demonstra que o

mundo natural continua a fornecer um grande número de moléculas novas e bioativas ano após ano (PYE et al., 2017), assim justificando e estimulando o desenvolvimento desse tipo de pesquisa.

Nesse contexto o presente estudo teve como objetivo buscar novas fontes de metabólitos com atividade terapêutica, incluindo atividade antimicrobiana, antiparasitária e antitumoral. Além disso, também buscou-se otimizar condições de cultivo para a produção do caldo fermentado visando atingir a maior quantidade e diversidade de metabólitos secundários com ação biológica. Assim, foram utilizados para esse fim, diferentes tipos de cultivos, abrangendo diversificação do meio de cultura utilizado, de tempo, e ainda a utilização de cultivo misto como estratégia do aumento na produção dos metabólitos de interesse ou ainda na produção de novos metabólitos secundários.

Microrganismos endofíticos e rizosféricos obtidos das espécies vegetais *Xylopiá Aromática* (encontrada no cerrado) e *Coffea arábica* foram explorados quanto ao seu potencial antimicrobiano. Uma vez que os microrganismos isolados do café apresentam grande capacidade na produção de enzimas biotecnológicas, assim como na promoção de crescimento vegetal, como sugerido por ANDRADE (2019).

Os caldos fermentados a partir de *P. polymyxa* e seus cultivos mistos foram avaliados quanto a presença de metabólitos secundários com ações de interesse antimicrobiano, leishmanicida, antitumoral. Também foi realizado o perfil de citotoxicidade do mesmo.

Em relação aos microrganismos citados, isolados a partir da *Xylopiá aromática* e *Coffea arábica* foi realizado uma triagem de seu potencial antimicrobiano. Cepas que apresentaram algum indício de produção de metabólitos com atividade antimicrobiana foram selecionadas para que pudessem e possam serem mais exploradas.

Foi então utilizado cepas de microrganismos endofíticos isolados de três diferentes fontes vegetais: 1- *Xylopiá aromática*, conhecida popularmente como Pimenta dedo de macaco, suas amostras foram coletadas no cerrado da UFSCar; 2- *Coffea arabica*, coletadas em estudo realizado por (ANDRADE;

2019), o qual visou identificar microrganismos endofíticos com capacidade enzimática e avalia-los quanto ao seu potencial em relação a promoção de crescimento vegetal; 3- *Prunus* sp., conhecido popularmente como Pessequeiro do Cerrado, essa árvore foi objetivo de estudo de SERRANO (SERRANO, 2011), onde foi isolado a cepa endofítica denominada *P. polymyxa* RNC-D, a qual já teve sua atividade antimicrobiana comprovada, assim como sua capacidade anti-inflamatória (CAVICCHIOLI, 2017).

2. Objetivo Geral

Realizar a bioprospecção de novos microrganismos endofíticos que possuam a capacidade de produção de metabólitos secundários com atividade antimicrobiana. Otimizar as condições de cultivo para a produção do caldo fermentado em cultivo misto visando atingir a maior quantidade e diversidade de metabólitos secundários com ação biológica, e então avaliar a eficácia dos mesmos em relação à: atividade antimicrobiana, atividade leishmanicida, atividade antitumoral, e por fim, traçar um perfil da citotoxicidade dos caldos fermentados em cultivo simples e cultivo misto.

CAPÍTULO 1: *Avaliação do potencial antimicrobiano, leishmanicida, antitumoral e perfil citotóxico dos cultivos puros e mistos de Paenibacillus polymyxa*

1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1 *Paenibacillus polymyxa*

Os microrganismos endofíticos foram mencionados pela primeira vez no início do século XIX; e apenas no final da década de 70 foi verificado que estes organismos possuem propriedades metabólicas de interesse em diversas áreas (STROBEL; DAISY, 2003). Estes fungos e bactérias, que colonizam o tecido interno (os espaços intracelulares e intercelulares) das plantas, sem indicar qualquer influência negativa em seu hospedeiro, constituem um grande reservatório de diversidade bacteriana com um impressionante potencial biotecnológico (RYAN et al., 2008).

Acredita-se que algumas bactérias endofíticas têm sua origem na rizosfera, penetram e colonizam tecidos da raiz para obterem um ponto de acesso ao xilema e, assim, disseminam-se por todas as partes da planta. O endófito *Paenibacillus polymyxa*, bactéria usualmente encontrada na rizosfera, provavelmente utiliza deste mecanismo para habitar plantas, isso devido ao fato do mesmo possuir capacidade em produzir enzimas hidrolíticas (NIELSEN; SORENSEN, 1997).

Em 1986, CLAUS & BERKELEY (CLAUS & BERKELEY; 1986) atribuíram a bactérias em forma de bastonete que se diferenciam em endosporos sob condições aeróbicas, o gênero *Bacillus*. Nesse gênero mais de 60 espécies eram reconhecidas, exibindo uma enorme variedade de fenótipos incluindo, por exemplo: aeróbios estritos, facultativos anaeróbios e até mesmo, acidófilos, alcalófilos, quimiolitotróficos, halófilos, psicrofilos e termófilos (CLAUS & BERKELEY, 1986).

Em 1991, ASH e colaboradores (ASH et al., 1991) demonstram a presença de 5 linhas altamente divergentes dentro do gênero *Bacillus* e sugeriram então uma nova divisão taxonômica. Em 1993, também ASH e colaboradores (ASH et al., 1993) a partir de informações genotípicas,

classificaram espécies anaeróbicas facultativas como o *Bacillus polymyxa* e semelhantes próximos em uma nova espécie denominada *Paenibacillus polymyxa*.

Esse gênero compreende mais de 30 espécies de bacilos GRAM-positivos que contém baixo conteúdo de citosina + guanina no material genético, sendo anaeróbios facultativos, formadores de esporos elípticos, neutrofilicos, periflagelados e heterotróficos (LORENTZ, 2006). Estes tem atraído considerável interesse devido ao seu grande potencial biotecnológico em diversos processos industriais assim como na agricultura sustentável (KIRAN, AKSHIT e CHRIS, 2016).

Considerando os resultados obtidos por SERRANO, (SERRANO, 2014) juntamente com dados da literatura tem-se que a molécula com relação massa/carga m/z 3376,453 Da, com espectro de atividade que abrange bactérias GRAM-negativas, GRAM-positivas e fungo, e cuja bioatividade é reduzida sob tratamento com lipase, representa um novo lipopeptídeo que foi denominado *polycerradin*. O extrato total do *P. polymyxa* RNC-D depois de fracionado em fase aquosa (FA) e extrato lipopeptídico (ELP), foi analisado através de cromatografia para identificação de seus compostos bioativos. Um dos peptídeos da FA teve sua sequência determinada como: glicina - ácido glutâmico - hidroxiprolina - glicina - alanina. A hidroxiprolina é um aminoácido não proteinogênico e não essencial com duas formas isoméricas, isto é, trans-4-hidroxi-L-prolina e trans-3-hidroxi-L-prolina. O extrato total obtido a partir da cepa *Paenibacillus polymyxa* RNC-D também mostrou indícios de bioatividade no controle de reação inflamatória (CAVICCHIOLI, 2017) e atividade leishmanicida contra *Leishmania amazonensis* (NERIS et al., 2018).

1.2 Cultivo Misto ou Cocultivo

Um endofítico em seu habitat natural, sofre uma constante interação com os microrganismos ali presentes, principalmente tratando-se de áreas amplamente colonizadas. Sobreviver em um ambiente competitivo requer certas estratégias, tais como a produção de metabólitos secundários bioativos (CHAGAS, 2014; KNIGHT et al., 2003).

Dessa maneira, grupos de genes potencialmente interessantes, como os responsáveis pela expressão de metabólitos que aumentam a competitividade no meio ambiente, podem estar silenciados nas condições consideradas não naturais de seu cultivo (CHAGAS, 2014). Uma das estratégias mais viáveis utilizada para mimetizar o ambiente microbiológico natural é cultivar um microrganismo em presença de outro, estabelecendo então um cocultivo, cultivo misto, ou ainda, consorcio microbiano. Foi verificado em diversos estudos que a utilização de culturas mistas estimulou a produção de metabólitos secundários e aumentou a atividade biológica de extratos microbianos (CHAGAS, 2014).

Quando comparado com culturas puras, o cultivo misto ou cocultivo pode ampliar os espectros de utilização do substrato. A lignocelulose (lignina + celulose) é o recurso sustentável mais abundante disponível ao microrganismo, no entanto, uma única cepa geralmente não pode utilizá-la diretamente para sintetizar produtos de grande interesse (DENG et al., 2016; JIANG et al., 2019). Uma única célula hospedeira também não pode fornecer o ambiente ideal para que todas as funções enzimáticas se desempenhem bem, enquanto o cultivo misto pode fornecer ambientes celulares diversificados para diferentes enzimas. Além disso, o consumo excessivo de recursos celulares e a grande carga metabólica, geralmente levam ao crescimento prejudicado da cepa de hospedeiro único (WU et al., 2016; ZHOU et al., 2016).

Os consórcios microbianos podem reduzir essa carga metabólica através da estratégia de divisão do trabalho, que além de beneficiar o crescimento de cepas individuais, também melhora o desempenho da bioprodução geral. Atualmente os sistemas de cultivo misto vem sendo empregados para a produção de biocombustíveis, produtos químicos e produtos naturais como alcaloides, policetídeos, terpenos, flavonoides, etc. (CHEN et al., 2019; WANG et al., 2016). Esses consórcios microbianos artificiais interagem mutuamente principalmente através de interações de sinergismo, comensalismo, competição e mutualismo.

Outro importante fator a ser considerado é o de que em uma cultura pura, a maioria das cepas possui condições individuais adequadas para o crescimento. Se as condições culturais mudassem, o crescimento e o metabolismo destas cepas seriam gravemente afetados, enquanto no cultivo

misto, poderiam suportar ambientes mais mutáveis fornecendo uma nova e importante fronteira para a produção industrial (JIANG et al., 2019).

Os consórcios microbianos encontrados em compartimentos ambientais podem ser denominados como consórcios naturais, estes são encontrados inclusive em ambientes extremos, como fontes termais e fundos marinhos, e constituem entre eles um modelo com maior eficiência do que as populações isoladas (JORGENSEN et al., 2012; PAERL; PINCKNEY, 1996; ZHANG et al., 2018). A cooperação é um dos princípios fundamentais seguidos pelos consórcios microbianos naturais e artificiais para manter um estilo de vida estável a longo prazo. Para superar a escassez de recursos na natureza, os microrganismos estabelecem uma 'rede de divisão de recursos' para apoiar membros individuais, incluindo a produção, transferência e utilização de recursos. Uma via importante que os microrganismos utilizam é a alimentação cruzada, na qual os metabólitos produzidos por um membro são utilizados por outro. A troca de metabólitos e os sinais de comunicação entre os membros do consórcio podem melhorar o objetivo final de um cultivo misto em comparação a um cultivo simples e pode ampliar significativamente o carbono e espectro de energia para cada membro. A troca de metabólitos é comum em consórcios naturais e também pode resultar em alimentação cruzada cooperativa, na qual um membro dos consórcios evoluiu para começar a produzir quantidades crescentes de um determinado metabólito para o benefício de outro (ZHANG et al., 2018).

Em consórcios naturais encontrados na microbiota oral humana, foi investigado a cooperação estabelecida entre *Streptococcus mutans* e *Candida albicans*, permitindo a formação de um forte biofilme nos dentes. Enquanto isso afeta negativamente o hospedeiro humano dificultando as opções de tratamento oral, esse relacionamento bacteriano-fúngico pode favorecer-los facilitando aplicações que exigem forte formação de biofilme e aumentando sua capacidade resistência (HWANG et al., 2017).

Contribuindo com as informações anteriores, em um estudo realizado por ZHANG e colaboradores (ZHANG et al., 2017), após uma análise dos perfis de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) dos extratos de cultivo misto de linhagens de fungos endofíticos do mangue e *Acinetobacter johnsonii*,

juntamente com seus extratos de monocultura, constatou-se que o cocultivo de *Trichoderma sp. 307* e *Acinetobacter johnsonii* levaram à produção significativa de metabólitos diferentes daqueles produzidos no cultivo puro de controles de fungos e bactérias.

Um cultivo misto interespecies geralmente ajuda a alcançar os resultados desejados, ao mesmo tempo em que fornece flexibilidade para estratégias de otimização e requisitos de nutrientes (por exemplo, fontes de carbono). Por outro lado, utilizando um design de consórcio entre fungos e bactérias, funções microbianas heterólogas podem ser utilizadas para montar novas vias bioquímicas gerando produtos exclusivos. Compostos orgânicos voláteis produzidos pelo fungo *Fusarium culmorum* induziram a expressão de uma ampla variedade de genes e proteínas da bactéria *Serratia plymuthica*, incluindo a produção de um terpeno previamente desconhecido que pode desempenhar um papel na comunicação de longa distância entre fungos e bactérias (SCHMIDT et al., 2017).

Buscando endofíticos fúngicos capazes de produzir antibióticos, foi isolado um fungo, *Pleosporales sp. F46*, da planta medicinal *Mahonia fortunei* coletada em Qingdao, República Popular da China. Comprovou-se que tal cepa possui potencial capacidade biossintética. Para maximizar a diversidade de compostos produzidos pelo endofítico, o método de cocultivo foi empregado objetivando o acesso a vias metabólicas silenciadas e resultando no isolamento de um novo derivado de ergosterol que teve sua capacidade antimicrobiana comprovada (WANG et al., 2019). Outro estudo demonstra a biossíntese do antibiótico pestalona pelo fungo *Pestalotia sp.*, como um exemplo de indução da expressão de uma rota biossintética em resposta ao cocultivo com bactéria marinha unicelular (CUETO et al., 2001).

O cultivo simples do fungo endofítico *Bionectria sp.* produziu um novo alcaloide, juntamente com outros cinco compostos conhecidos. Já o cocultivo deste fungo com *Bacillus subtilis* ou com *Streptomyces lividans* resultou na produção de duas novas amidas, além de dois compostos conhecidos. Como certos compostos não foram detectados nos cultivos simples do fungo ou das bactérias, foi indicado uma ativação de grupos silenciosos de genes através do cocultivo de fungos e bactérias (KAMDEM et al., 2018).

Em outro estudo, um total de 112 cepas de actinobactérias coletadas no Japão foram submetidas ao cocultivo com a bactéria *Tsukamurella pulmonis*. Os picos analisados de HPLC correspondentes foram comparados entre culturas puras e culturas mistas, os resultados apontaram que 99 de 112 cepas apresentaram mudanças nos padrões de metabolismo secundário no cocultivo. Entre essas cepas, 41 produziram novos metabólitos somente em cultivo misto, revelando que *T. pulmonis* alterou o metabólito secundário de actinomicetos em 88% (ONAKA, 2017). Há também relatos dentro de nosso grupo de pesquisa em que o cocultivo do *Streptomyces* spp. com *C. albicans* iniciou a produção de substâncias bioativas em 24 horas, enquanto em cultivo simples a bioatividade teve início em 40 horas. O pico de produção de substâncias ocorreu em 72 horas em ambos e a formação de maiores halos de inibição ocorre no cocultivo, demonstrando assim uma maior eficiência deste tipo de cultivo (ASSIS, 2018).

1.3 Atividade Antimicrobiana

Os antibióticos foram uma das maiores descobertas do século XX. Descobertos por acaso, por Alexander Fleming, em 1928, quando esse esqueceu uma placa com *Staphylococcus aureus* aberta em seu laboratório ao sair de férias. Ao retornar semanas depois para o local de trabalho percebeu que um fungo, posteriormente identificado como pertencente ao gênero *Penicillium*, era capaz de inibir o crescimento do microrganismo patogênico. Então a substância responsável pela inibição que recebeu o nome de penicilina, tornou-se o primeiro antibiótico do mundo (FIOCRUZ, [s.d.]).

Segundo STROBEL & DEISE (STROBEL; DAISY, 2003), antibiótico pode ser definido como uma substância de baixo peso molecular produzido por microrganismos que apresentam atividade em baixas concentrações contra outros microrganismos. Atualmente há uma necessidade muito grande de desenvolvimento de novos antibióticos visando tratar infecções causadas por agentes patogênicos que de alguma maneira evoluíram para a resistência aos antibióticos mais comuns (SANCHEZ e DEMAIN, 2014; ALVIN; MILLER; NEILAN, 2014).

Habitualmente, antibióticos tendem a perder sua eficácia com o passar do tempo devido ao surgimento e disseminação de resistência entre agentes

patogênicos (ROSSOLINI et al., 2014). A resistência à antibióticos é um dos principais problemas relacionados ao cuidado à saúde da atualidade, pois impacta diretamente nas opções de tratamento, no aumento da mortalidade, no controle de infecção e ainda gera questões econômicas. Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS) 90% das linhagens bacterianas são resistentes a drogas de primeira escolha. Portanto, a busca por novas moléculas com atividade antimicrobiana é urgente. Em fevereiro de 2017, a OMS liberou sua primeira lista de agentes patogênicos prioritários para a pesquisa e desenvolvimento de novos antibióticos, na qual a *P. aeruginosa* resistente a Carbapena foi classificada como prioridade crítica e *S. aureus* metilina resistente (MRSA) foi classificado como prioridade alta. Além disso, a resistência da levedura *C. albicans* aos fungicidas atuais também tem aumentando nos últimos anos (SANGLARD, 2016).

A resistência aos antibióticos pode ser adquirida, quando há transferência horizontal de genes, ou evoluída, quando há resistência mutacional, incluindo três mecanismos principais que são: alteração dos alvos dos antibióticos, degradação ou modificação química dos antibióticos e captação reduzida ou aumento do efluxo através da parede celular bacteriana. Esses mecanismos são estimulados por vários genes e frequentemente estão associados a outras características bacterianas importantes para a sobrevivência no hospedeiro humano (SOMMER; MOLIN; JOHANSEN, 2020)

Diversos metabólitos produzidos por endófitos microbianos atuam como agentes antimicrobianos contra patógenos humanos, vegetais e animais, assim a eficácia desses metabólitos demonstram um grande potencial clínico para diversos tratamentos médicos e veterinários. Os antibióticos que ocorrem na natureza são produtos de baixo peso molecular produzidos por micróbios que inibem o crescimento ou ainda matam fitopatógenos, bactérias, fungos, vírus e protozoários, que estão relacionados com doenças humanas e animais (DEMAIN, 1981; EK-RAMOS et al., 2019; TRIPATHI et al., 2018).

A bioprospecção de produtos naturais é uma rica fonte para a descoberta de novos fármacos por meio de isolamento de metabólitos de organismos vivos (ALVIN; MILLER; NEILAN, 2014; CAVICCHIOLI, 2017). Os microrganismos, principalmente os endófitos, produzem uma imensurável diversidade de

metabólitos raros que abrangem diferentes ações, dentre elas, autodefesa, agressão e principalmente comunicação intercomunidades. Muitos destes compostos, comumente apresentam valiosa atividade biológica (HUTCHINSON, 1999). Estima-se que aproximadamente metade dos antibióticos produzidos industrialmente, além de outros diversos compostos comercializados como agentes imunossupressores, quimioterápicos, e vermífugos, sejam produzidos por esses organismos (DA CRUZ et al., 2015).

Sabe-se que indivíduos imunocomprometidos (pacientes com AIDS, câncer e transplante de órgãos) apresentam alto risco de desenvolver infecções microbianas oportunistas por *Clostridium difficile*, *Escherichia coli*, *Micrococcus luteus*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Pneumocystis jirovecii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella sp.*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, dentre outros, além de infecções parasitárias que podem ser causadas por *Cryptosporidium spp.*, *Encephalitozoon spp.*, *Isospora belli*, *Leishmania sp.* e *Trypanosoma cruzi*. A necessidade de prevenção e tratamento de doenças humanas causadas pelos microrganismos citados acima levou a descoberta e o desenvolvimento de novos e eficazes agentes terapêuticos aos quais não foi produzida resistência (CHINEDUM, 2005; EK-RAMOS et al., 2019; STROBEL; DAISY, 2003).

As principais classes dos compostos químicos isolados de actinobactérias, assim como bactérias endofíticas, incluem policetídeos, peptídeos não ribossomais, terpenos e alcaloides. Estes compostos são sintetizados, respectivamente, por complexos enzimáticos conhecidos como policetídeo sintase (PKS), peptídeo não ribossomal sintetase (NRPS), terpeno sintase (TS) e dimetilail difosfato triptofano sintase (DMATS) (COLLEMARE et al., 2008). Devido a estes fatores, alguns estudos tem avaliado seus isolados bacterianos quanto ao seu potencial biossintético de produzir metabólitos secundários por PCR dos genes PKS I, PKS II e NRPS (CHEN et al., 2019; SHAN et al., 2018).

Compostos da classe dos peptídeos são comumente produzidos por microrganismos endofíticos e podem ser sintetizados em duas vias, a via ribossomal e a não-ribossomal que incluem peptídeos modificados e amplamente produzidos por bactérias (NETT; IKEDA; MOORE, 2009).

Policetídeos e peptídeos não ribossomais são metabólitos secundários de grande importância que por sua vez apresentam uma ampla diversidade estrutural e diversas aplicações farmacêuticas, incluindo uma série de medicamentos de grande importância clínica (LETUNIC et al., 2008; WANG; SIVONEN; FEWER, 2015).

Organismos vivos de todos os tipos podem ser produtores de um grupo diversificado de moléculas que são chamadas de peptídeos antimicrobianos (PAMs) os quais também fazem parte do sistema imune inato (GIULIANI; PIRRI; NICOLETTO, 2007). Há uma grande diversidade de PAMs, porém em sua maioria, eles agem danificando a membrana celular através da formação de poros, levando ao efluxo de substâncias que desestabilizam a célula e resulta em morte (PETERS; SHIRTLIFF; JABRA-RIZK, 2010). É importante citar que uma característica essencial dos PAMs é sua preferência por interações microbianas, o que em muitos casos os tornam não tóxicos as células de mamíferos. Estes peptídeos abrangem atividades sobre bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, protozoários, leveduras, fungos e vírus. Os PAMs demonstram em sua maioria serem bactericidas e não bacteriostáticos, pois agem rapidamente sobre o microrganismo causando sua morte. Estudos também demonstraram algumas funções imunomoduladoras dos PAMs, ou seja, atuando como quimiocinas ou ainda induzindo sua produção, podendo também induzir a produção de citocinas pró-inflamatórias promovendo cicatrização e modulando repostas de células dendríticas e da resposta imune adaptativa (FENG; WANG; YU, 2017).

Complementando, os lipopeptídeos são moléculas constituídas por uma sequência de aminoácidos que podem estar dispostos de forma linear ou cíclica, na qual uma porção lipídica está associada. Esses compostos apresentam-se ativos contra um grande número de espécies de bactérias e fungos (ONGENA; JACQUES, 2008).

1.4 Atividade Leishmanicida

As leishmanioses são doenças consideradas negligenciadas e endêmicas em 98 países, com maior ocorrência em países emergentes e estão entre uma das seis enfermidades tropicais prioritárias à saúde pública global. Cerca de 1

bilhão de pessoas estão em áreas consideradas de risco. A doença está associada à desnutrição, condições precárias de habitação e sistema imunológico debilitado. As manifestações clínicas incluem as formas visceral e cutânea da doença, que juntas causam quase 1,6 milhão de casos por ano (ALVAR et al., 2012; ANSTEAD et al., 2001).

As leishmanioses possuem várias formas clínicas divididas em: Leishmaniose Tegumentar (LT) e Leishmaniose Visceral (LV). A LV é caracterizada por febres irregulares, anemia, perda de peso, aumento do baço e do fígado (WHO, 2018). A LT, forma cutânea da doença, é a mais comum, podendo ser subdividida em cutânea, cutânea difusa e muco cutânea. Resumidamente apenas dez países representam 70% a 75% da incidência global estimada de LT, sendo estes: Afeganistão, Argélia, Colômbia, Brasil, Irã, Síria, Etiópia, Sudão do Norte, Costa Rica e Peru (AKHOUNDI et al., 2016; ALVAR et al., 2012). A LT é caracterizada por causar úlceras espalhadas pelo corpo (rosto, braços e pernas), o que pode causar incapacidade e exclusão social do indivíduo acometido. Quando as úlceras cicatrizam, sistematicamente deixam cicatrizes permanentes sendo, muitas vezes, a causa de um grave prejuízo social (PELLISSARI et al., 2011).

A infecção por leishmania ocorre quando insetos hematófagos (fêmeas) sugam o sangue do indivíduo contaminado contendo amastigotas ou macrófagos infectados. Então, já no trato digestivo do inseto, ocorrerá o rompimento da membrana dos macrófagos infectados e as amastigotas liberadas irão se diferenciar na forma promastigota. Estas formas são afiladas, exibem flagelo livre e se multiplicam no intestino do vetor (GOSSAGE; ROGERS; BATES, 2003). As formas promastigotas perdem a capacidade de adesão ao epitélio do intestino do vetor tornando-se móveis e infectantes chamadas de metacíclicas (AKOPYANTS et al., 2004). As formas metacíclicas infectantes migram para a probóscide do vetor onde serão transmitidas para o hospedeiro vertebrado durante a picada do flebotomíneo (Figura1), (PETERSEN; GREENLEE, 2011). Finalmente, no local da picada, as formas metacíclicas são fagocitadas por células do sistema fagocítico mononuclear, assim as promastigotas sobreviventes se diferenciam em amastigotas (COURRET et al., 2002), sendo esta responsável pelo estabelecimento da doença e disseminação da infecção pela sua replicação no interior da célula hospedeira (HENARD et al., 2014).

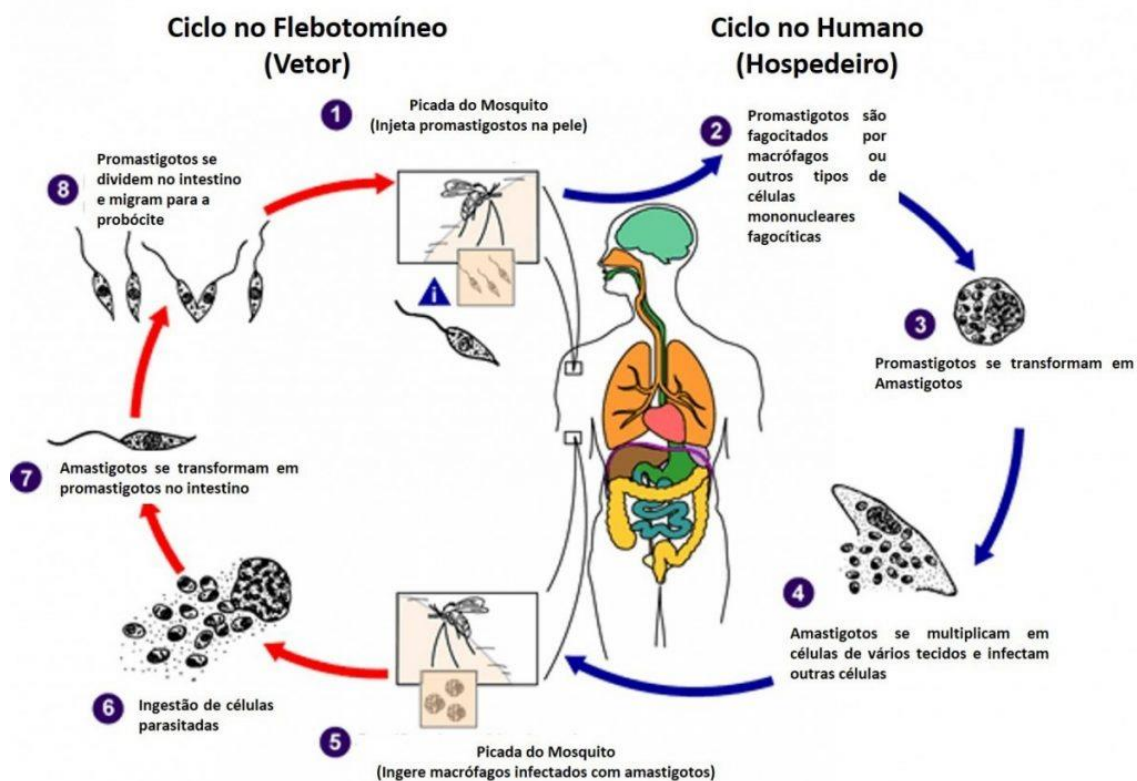


Figura 1: Ciclo de vida da *Leishmania*. (Imagem de *Centers for Disease Control and Prevention Image Library*, adaptada).

Em 2017, 20.792 dos 22.145 (94%) novos casos relatados à OMS ocorreram em sete países: Brasil, Etiópia, Índia, Quênia, Somália, Sudão do Sul e Sudão. Quase 90% dos casos de leishmaniose muco cutânea ocorrem nos países: Bolívia, Brasil e Peru (WHO, 2018). Estes dados ressaltam a grande importância da pesquisa de novos compostos ativos contra esse tipo de organismo.

Os antimoniais pentavalentes, como o Pentostan e o Glucantime, têm sido utilizados há muitos anos como as drogas de primeira escolha quando se trata de leishmaniose, embora estes apresentem resultados clínicos satisfatórios contra a leishmaniose tegumentar, o tratamento da doença apresenta eficácia limitada e desvantagens como: administração parenteral diária, toxicidade, tratamentos prolongados e hospitalização do paciente (CHAKRAVARTY; SUNDAR, 2010). A Anfotericina B e a Pentamidina são as drogas de segunda escolha apesar das desvantagens significativas, em especial em termos de eficácia, custo, duração do tratamento, toxicidade e via de administração (MACIEL-REZENDE et al., 2013).

1.5 Citotoxicidade e Atividade antitumoral

Técnicas de cultura celular são consideradas uma das alternativas mais confiáveis para a avaliação do crescimento, morfologia e fisiologia das células. A proliferação de células vivas de animais pode ser observada *in vitro* por um período considerável desde que sejam supridas todas as necessidades fisiológicas e nutricionais das células fornecidas geralmente por um composto líquido denominado por meio de cultura. A aplicação de pesquisas *in vitro* é ampla e pode ser desenvolvida a partir de cultura de células, assim podemos citar: os estudos fisiológicos e bioquímicos de células normais e tumorais; avaliação dos efeitos de composições químicas ou fármacos diversos sobre tipos específicos de células; geração de tecidos artificiais; síntese de materiais biológicos, síntese de proteínas recombinantes, dentre outros.

O câncer é na atualidade um dos mais importantes problemas de saúde pública mundial, sendo a doença que mais causa mortes. Esta patologia é caracterizada pelo crescimento descontrolado e desordenado de algumas células que por meio de mutações se tornam não adeptas aos sinais de controle de proliferação, morte e diferenciação celular. Essas mutações levam a alterações na expressão ou função de genes-chave importantes para estes processos (ALMEIDA et al., 2005). Se tratando de endofíticos correlacionados a atividade antitumoral, não tem como deixar de se citar o clássico exemplo do Taxol. Este diterpenóide é uma das drogas anticâncer mais potentes, aprovado pelo FDA (*Food and Drug Administration*), porém devido a coleta indiscriminada da árvore que o produz, seu acesso já esteve limitado. Foi então que estudos verificaram que o Taxol também pode ser obtido a partir da fermentação do endofítico *Taxomyces andreanae* e a partir desse momento, vários pesquisadores publicaram ter encontrado novos endofíticos produtores de Taxol (STIERLE et al., 1993; STROBEL et al., 1996; LI et al., 1996; WANG et al., 2000; PURI et al., 2005; AMRANI et al., 2012).

Nos últimos anos, há um interesse crescente no desenvolvimento de terapias complementares e novas alternativas às drogas atualmente disponíveis no mercado, uma vez que as terapias atuais como quimioterapia e radioterapia afetam não somente células tumorais, mas também não tumorais, causando muitos efeitos colaterais não desejáveis. Mesmo com o grande avanço científico

na área médica que tivemos na última década, o tratamento para o câncer ainda apresenta inúmeras limitações. Neste contexto, a busca por novas substâncias com potencial bioatividade ainda é de grande importância, sendo os endofíticos uma rica fonte para busca de novos metabólitos ativos (GONZÁLEZ et al., 2020)

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivos específicos

- Padronizar melhores condições de cultivo das culturas mistas de *Paenibacillus polymyxa*;
- Empregar a técnica cultivo misto utilizando *Paenibacillus polymyxa*, juntamente com cepas potencialmente patogênicas utilizadas como indicadores e avaliar a atividade dos caldos fermentados. Assim como, usar da mesma técnica utilizando fungos fitopatogênicos;
- Avaliar os caldos fermentados de cultivo simples e misto para determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) contra 8 diferentes cepas bacterianas potencialmente patogênicas, comparando os mesmos;
- Avaliar os caldos fermentados de cultivo simples e misto para determinação da Concentração Bactericida Mínima (CBM) contra 8 diferentes cepas bacterianas potencialmente patogênicas, comparando os mesmos;
- Avaliar os caldos fermentados de cultivo simples e misto para determinação de sua atividade leishmanicida (*in vitro*);
- Avaliar os caldos fermentados de cultivo simples e misto que apresentarem melhores resultados para determinação de sua citotoxicidade (*in vitro*);
- Avaliar os caldos fermentados de cultivo simples e misto que apresentarem melhores resultados para determinação de sua atividade antitumoral (*in vitro*);

3 METODOLOGIA

3.1 Cultivo simples

As culturas simples de *Paenibacillus polymyxa*, assim como das bactérias potencialmente patogênicas: *S. aureus* e *E. coli* e da levedura *Candida albicans* foram preparadas e utilizadas como controle para a bioatividade dos cultivos mistos.

3.1.1 Cultivo simples de *Paenibacillus polymyxa*

Para a produção do caldo fermentado por *P. polymyxa*, foi utilizado o modelo seguido por SERRANO (SERRANO; 2012), onde foi determinada a concentração de 16 g/L de glicose no meio *International Streptomyces Project Medium (number 2)*, (ISP2) e suplementação com 1% de peptona bacteriológica, como meio ótimo para a estimulação e produção de metabólitos secundários. Todas as cepas citadas estão depositadas na coleção de culturas do Laboratório de Microbiologia e Biomoléculas (LaMiB) do Departamento de Morfologia e Patologia (DMP) Universidade Federal de São Carlos (UFSCar).

Cepas de *P. polymyxa* previamente reativadas em caldo ISP2 modificado foram semeadas em placas com meio ISP2 modificado pela técnica de esgotamento, as placas foram mantidas em estufa bacteriológica 48 horas à 28 °C. A partir do cultivo de 48 horas de incubação, obteve-se duas colônias isoladas que foram adicionadas em 50mL de caldo de cultivo, estas, foram incubadas por 24 horas a 28 °C e 180 rpm, foi então retirado 1 mL deste para realizar a leitura de absorbância do caldo fermentado, após a leitura ajustou-se a concentração da solução de inóculo para 0,1 de absorbância. Então 5% (v/v) do inóculo foram transferidos para um Erlenmeyer contendo 150 mL do meio de produção (Figura 2). Este Erlenmeyer foi mantido em shaker orbital a 180 rpm, à 30 °C por 168 horas. Após este processo os caldos foram fracionados em tubos de fundo cônico de 50 mL e centrifugados à 10.000 rpm por 20 minutos na temperatura de 4°C.

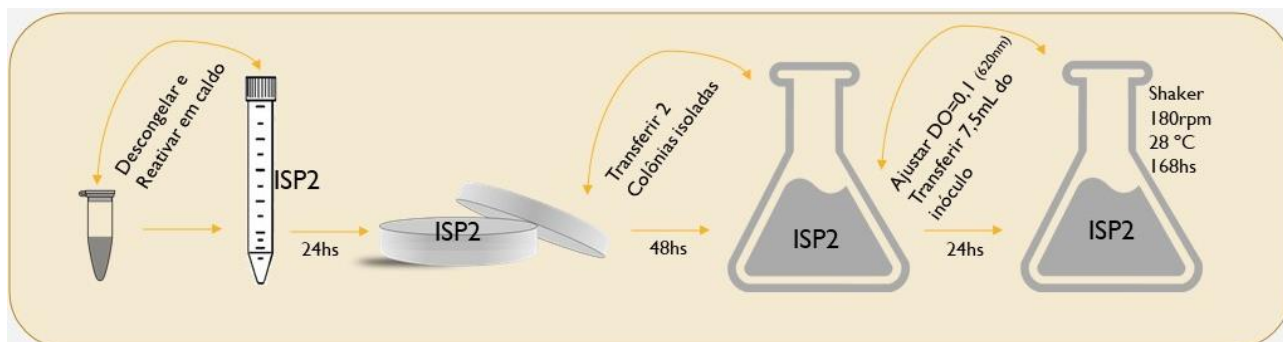


Figura 2: Esquema demonstrativo da sequência de passos para produção do caldo fermentado por *P. polymyxa* em cultivo simples

3.1.2 Cultivo simples dos demais microrganismos utilizados como estimuladores

As cepas utilizadas para essa etapa foram: *S. aureus*, *E. coli*, e *C. albicans*, foi preconizado o uso de uma bactéria Gram-positiva, uma Gram-negativa e uma levedura. Todas as cepas foram descongeladas e reativadas, sendo que as cepas bacterianas foram reativadas em *Trypticase Soy Broth* (TSB) e as cepas de *C. albicans* foram reativadas em *Potato Dextrose Broth* (PDB). Ambas foram mantidas em estufa a 37 °C por, no mínimo, 24 horas. Após o tempo estabelecido, as cepas bacterianas foram semeadas em placas contendo *Trypticase Soy Agar* (TSA) e cepas fúngicas em *Potato Dextrose Agar* (PDA) pela técnica de esgotamento. A partir do cultivo de 48 horas de incubação, obteve-se quatro colônias que foram adicionadas em 20 mL de caldo de cultivo, estas, foram incubadas 24 horas a 28 °C e 180 rpm. Então, foi retirado 1 mL destes para realização da leitura de absorbância do caldo fermentado, após a leitura, ajustou-se a concentração da solução para 0,1 de absorbância (Fórmula 1), que corresponde a concentração de $1,5 \times 10^8$ Unidades Formadoras de Colônia por mL (UFC/mL) (ANVISA, 2008).

$C_1 = 0,978(\text{abs})$ cultivo de 24 horas

$C_2 = 0,1$ (abs) concentração desejada

$V_2 = 20 \text{ mL} = 20000 \mu\text{L}$ volume final

$$C_1 \times V_1 = C_2 \times V_2$$

$$V_1 = \frac{C_2 \times V_2}{C_1} = \frac{0.1(\text{abs}) \times 20000\mu\text{l}}{0.978 (\text{abs})} = 2045\mu\text{L}$$

(volume do cultivo de 24 horas)

Equação 1: Cálculo para ajuste da concentração do pré-inoculo à 0,1 de absorvância

Usando a Equação 1 como exemplo, pipetou-se então 2045 μL desse caldo fermentado e completou-se com 17955 μL de solução salina estéril, totalizando 20000 μL em uma concentração de 0,1 de absorvância. Então 7,5 mL do inóculo (5% v/v) de cada uma das cepas potencialmente patogênicas foi transferido para um *Erlenmeyer* contendo 150 mL de TSB (*S. aureus* e *E. coli*) e 150 mL de PDB (*C. albicans*).

Os cultivos simples de microrganismos potencialmente patogênicos foram utilizados apenas como controle para a bioatividade dos cultivos mistos.

3.2 Cultivo Misto

3.2.1 Cultivo misto de bactérias endofíticas com microrganismos potencialmente patogênicos

Os microrganismos endofíticos foram cultivados em meio ISP2 modificado nas condições descritas na sessão 4.1.1 para obtenção do inóculo. Os inóculos de microrganismos potencialmente patogênicos *E. coli*, *S. aureus* e *C. albicans* foram cultivados como descrito na seção 4.1.2.

Posteriormente, 5% (v/v) do inóculo do microrganismo endofítico e 0,1% (v/v) do microrganismo indicador (IGARASHI, 2005 adaptado) foram adicionados em tubos de fundo cônico contendo 5 mL de ISP2. Os tubos foram incubados a 28 °C e 180 rpm por 168 horas em *shaker* orbital. Após cada um dos períodos pré-estabelecidos os caldos fermentados foram centrifugados a 10.000 rpm por 20 minutos na temperatura média de 4 °C, para que houvesse subtração de células e restos celulares. Cada caldo fermentado antes de ser testado foi filtrado em filtro de celulose para seringa de 0,22 μm para esterilização.

3.2.2 Cultivo misto de bactérias endofíticas com fungos fitopatogênicos

Foram realizadas culturas mistas envolvendo um fungo fitopatogênico e uma bactéria endofítica. Os fungos utilizados na produção dos cultivos mistos foram: F1 – *Ceratocystes paradoxa* e F2 – *Moniliophthora paradoxa* (Tabela 1). A partir destes dois fitopatógenos foram preparados os cultivos mistos para posterior análise de atividade antibacteriana. Também foi preparado um caldo de cultivo simples contendo apenas o fungo fitopatógeno utilizado neste experimento para que fosse utilizado como controle.

Para este experimento, os dois fitopatógenos citados acima foram reativados em PDA e mantidos por 7 dias à 28 °C. Após esse período foram cortados de maneira asséptica 9 discos de ágar + fungo, e posteriormente adicionados em um *Erlenmeyer* 500 mL, contendo 150 mL de caldo batata. Estes caldos foram mantidos em *shaker* orbital, por 3 dias, à 120 rpm e 30 °C. Simultaneamente, foi preparado o caldo fermentado a partir de *P. polymyxa* como já citado anteriormente. O cultivo misto foi iniciado com a adição de 4 mL do cultivo de três dias das bactérias endofíticas sendo adicionado aos 150 mL do cultivo, também de três dias, dos fungos mencionados. Esse cultivo misto foi mantido em *shaker* orbital por mais 11 dias, à 120 rpm e 30 °C. Após extração dos microrganismos por centrifugação à 10.000 rpm, 4 °C por 20 minutos, foram obtidos os caldos fermentados (CHAGAS, 2014).

Tabela 1: Relação dos cultivos mistos realizados; Cepa endofítica mais cepa indicadora.

Caldo Fermentado Misto	Endofítico (+)	Microrganismos indicadores
CFM 1	<i>P. polymyxa</i>	<i>S. aureus</i>
CFM 2	<i>P. polymyxa</i>	<i>E. coli</i>
CFM 3	<i>P. polymyxa</i>	<i>C. albicans</i>
CFM 4	<i>P. polymyxa</i>	<i>C. paradoxa</i>
CFM 5	<i>P. polymyxa</i>	<i>M. paradoxa</i>

Totalizaram-se então, neste primeiro momento, cinco diferentes cultivos mistos, mais cinco controles, incluindo as culturas puras de cepas indicadoras de microrganismos potencialmente patogênicos e fungos fitopatogênicos utilizados para a estimulação da produção de metabólitos secundários a partir dos endofíticos.

3.3 Curva de Bioatividade

Foi avaliada a bioatividade dos caldos fermentados (CF) coletados a cada 24 horas, tendo-se então os tempos de: 24, 48, 72, 96, 120, 144 e 168 horas. Foram utilizados para este ensaio todos os caldos fermentados citados anteriormente. Para o bioensaio de atividade antimicrobiana em diferentes tempos, os caldos fermentados foram cultivados em tubos de fundo cônico, pois um menor volume foi utilizado para tal teste.

Após o preparo dos caldos fermentados de cultivo misto, os mesmos foram submetidos ao teste de antibiograma, para avaliação da atividade antimicrobiana dos caldos nos diferentes tempos já citados, frente as seguintes cepas: *S. aureus*, *E. coli* e *C. albicans*.

Para a avaliação da atividade antimicrobiana, as bactérias potencialmente patogênicas foram semeadas em meio TSA e cultivadas por 48 horas. Com o auxílio de um palito previamente esterilizado foi então retirado uma pequena alíquota de cada microrganismo utilizado, estas foram diluídas em tubos de ensaio contendo 5 mL de solução salina a 0,9% e ajustadas na escala 0,5 de Mc Farland em espectrofotômetro, o que corresponde a $1,5 \times 10^8$ UFC/mL (ANVISA, 2008).

Para o método de difusão em Ágar - Técnica do Disco e do Poço (GROVE e RANDALL, 1955), as placas contendo Ágar Mueller Hinton (MH, KASVI) preparadas antecipadamente, foram deixadas em repouso até atingir temperatura ambiente, posteriormente, com *swab* estéril, cada microrganismo potencialmente patogênico foi semeado em placa de Petri. Foram feitos poços de 9 mm de diâmetro com o uso da base de uma ponteira de 1000 μ L esterilizada. Em seguida, foi adicionado a cada poço 100 μ L do CF a ser avaliado. Após todo o procedimento as placas foram incubadas durante 24 horas a 37 °C para posterior leitura qualitativa de formação de halo (GROVE; RANDALL, 1954). Todos os testes foram realizados em triplicatas.

3.4 Ensaio de microdiluição

Para o ensaio de microdiluição, a metodologia utilizada foi a diluição em placa de 96 poços (VANDEN BERGHE; VLIETINCK 1991). Os microrganismos utilizados para o teste de microdiluição foram: *Escherichia coli* ATCC 25922, *Micrococcus luteus* ATCC 9341, *Salmonella setubal* ATCC 19196, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 14502, *B. subtilis*, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228 e *Staphylococcus saprophyticus*. Os inóculos dos microrganismos potencialmente patogênicos citados foram padronizados em 0,5 na escala de Mc Farland como citado anteriormente. Em seguida foi realizada uma diluição 1:10 em salina, onde então foram adicionados uma suspensão bacteriana de $1,0 \times 10^7$ UFC/mL (PATEL J.B., et al., 2015).

Em uma placa de 96 poços, foram adicionados em toda a placa, com exceção de onde foi realizado o controle, 100 μ L de caldo MH. Na coluna 1 adicionou-se a toda coluna 100 μ L do caldo fermentado a ser testado na concentração de $40000 \mu\text{g/mL}^{-1}$, resultando em uma primeira concentração de $20000 \mu\text{g/mL}^{-1}$. Realizou-se diluição seriada onde foram obtidas as concentrações de 10000; 5000; 2500 e $1250 \mu\text{g/mL}^{-1}$. Nos poços de controle, foram adicionados 100 μ L de caldo MH. Para finalizar foram adicionados 20 μ L da suspensão bacteriana previamente preparada nas linhas A, B, C e D, e 20 μ L de solução salina nas linhas E, F, G e H, sendo as primeiras 4 linhas os testes e as outras 4 linhas seus brancos, obtendo-se um volume final de 120 μ L por poço, (Figura 3). As microplacas foram incubadas em estufa à 37 °C por 24 horas. Após o período de incubação, foram adicionados 20 μ L 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 foram observados após 60 minutos \pm 20 minutos. Foi realizado a leitura das placas na absorbância a 620 nm, em leitora automática de microplacas (TP-READER NM-THERMO PLATE) (CLSI, 2012).

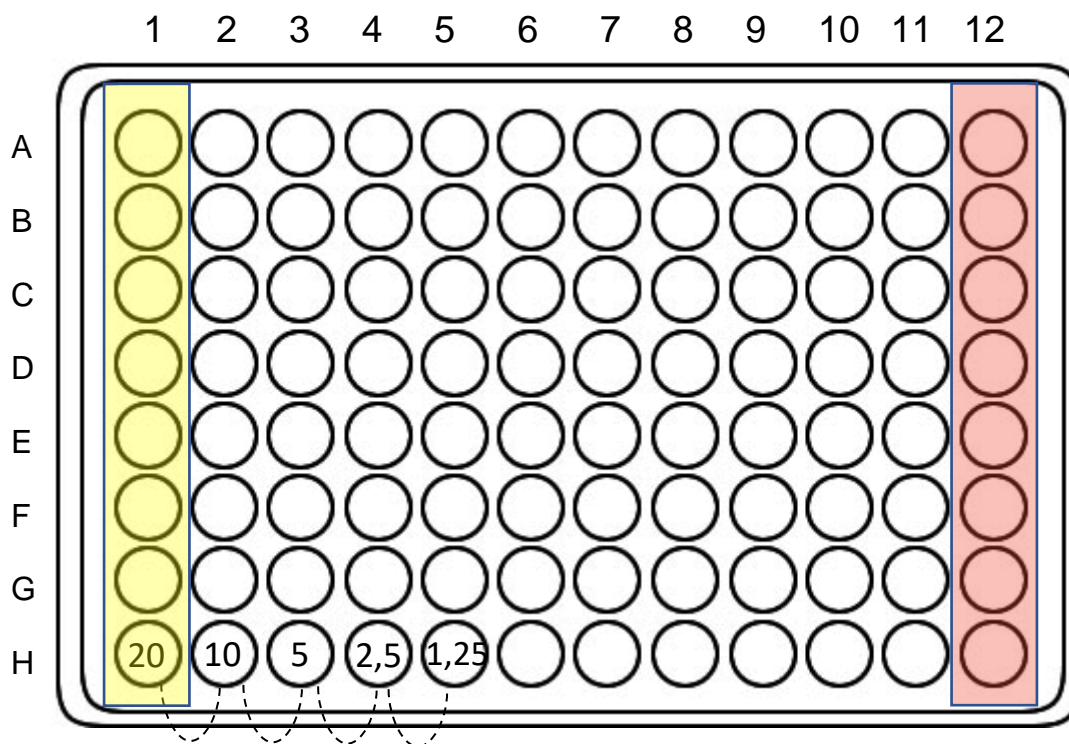


Figura 3: Placa de 96 poços representativa do teste de Microdiluição. A coluna 1 em amarelo representa a adição de 100 μ L do composto a ser testado, o qual foi submetido a diluição seriada como mostra as letras em cada poço da linha H; A coluna 12 em vermelho representa os poços de controle onde adicionou-se apenas 100 μ L de meio MH e 20 μ L da suspensão bacteriana.

3.5 Determinação da concentração bactericida mínima

A determinação da concentração bactericida mínima (CBM) foi realizada em paralelo ao teste para determinação da CIM. Antes de pingar o revelador nos poços da microplaca, foi retirada uma alíquota de 10 μ L de cada concentração e plaqueadas em ágar MH. As placas foram encubadas em estufa a 37 °C por 24 horas. A CBM foi definida a partir da menor concentração em que não houve crescimento bacteriano.

3.6 Curva de sobrevivência - *Time Kill test*

Para realização do teste de *Time Kill*, foram selecionados os resultados mais promissores envolvendo pelo menos uma cepa GRAM-positiva e uma cepa GRAM-negativa, sendo assim, foram selecionados: Caldo fermentado de *P.*

polymyxa mais *S. aureus*, para inibição de *E. coli* e *Pseudomonas aeruginosa* e Caldo fermentado de *P. polymyxa* mais *C. albicans* para inibição de *S. saprophyticus*. As concentrações utilizadas para o teste foram a CIM e CBM encontradas nos testes anteriores. Após padronização do inóculo conforme descrito na sessão 3.4, uma alíquota de 500 µL do mesmo foi adicionada em 2,5 mL de caldo MH já preparado com as concentrações dos compostos a serem testados. As concentrações utilizadas foram: 1250 µg/mL⁻¹ (CIM – *E. coli* e *Pseudomonas*), 2500 µg/mL⁻¹ (CBM – *E. coli* e *Pseudomonas*), 5000 µg/mL⁻¹ (CIM – *S. saprophyticus*), 20000 µg/mL⁻¹ (CBM – *S. saprophyticus*). Os tubos foram então incubados em estufa bacteriológica a 37 °C. Foram estabelecidos os seguintes intervalos de tempo para a elaboração da curva: 0, 2, 4, 6, 8, 10, 16, 24 horas. Assim uma alíquota de 100 µL de cada cultivo com seus respectivos tratamentos foi adicionada a 900 µL de solução salina 0,85% e então foi realizada diluição seriada até a diluição de 10⁻⁶ (CLSI, 2012). Após realizar a diluição seriada, 4 gotas de 15 µL de cada uma das diluições foram semeadas em Ágar Nutriente e incubadas a 37 °C por 24 horas, após esse período foi realizada a contagem de colônias (MILES e MISRA, 1938). Para o cálculo de unidades formadoras de colônia por mL (UFC/mL) foi utilizada a seguinte equação:

$$UFC.mL = \frac{(Média\ de\ colônias\ contadas\ x\ Diluição\ x\ 1000)}{Volume\ da\ gota\ em\ \mu L}$$

Equação 2: Formula para obtenção da UFC/mL

3.7 Atividade leishmanicida

As cepas de *Leishmania infantum chagasi* (forma promastigota) utilizadas para este experimento foram mantidas em criotudo e armazenadas em nitrogênio líquido, estas fazem parte da coleção do Laboratório de Inflamação e Doenças Infecciosas (LIDI) – DMP – UFSCar. Antes de se realizar o experimento é importante citar que estas cepas foram descongeladas e mantidas em frascos T (KASVI, BRA) de 25 cm² com 4 mL de meio 199 (SIGMA- ALDRICH, EUA), suplementado com soro fetal bovino (SFB) (LGC, BRA), antibióticos Penicilina/

Estreptomicina (GIBCO, EUA) e L-glutamina (SIGMA-ALDRICH, EUA), por no mínimo 72 horas, sendo que a cada 24 horas o meio era renovado assim mantendo sua viabilidade.

Em uma placa de 96 poços, adicionou-se aos poços 100 μL de meio 199, com exceção da coluna 12 que foi reservada para realização do controle, então na primeira coluna, adicionou-se 100 μL do caldo fermentado previamente diluído a $40000 \mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$ e filtrado, nas seguintes colunas realizou-se diluição seriada, obtendo-se então as concentrações de: $20000 \mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$, $10000 \mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$, $5000 \mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$, $2500 \mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$, $1250 \mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$. Nas linhas E, F, G e H adicionou-se mais 100 μL de meio 199 (branco) e nas linhas A, B, C e D adicionou-se 100 μL da suspensão celular de Leishmania a (1×10^6). Só então na última coluna (12) foram adicionados 100 μL de meio 199, após, nas linhas A, B, C e D adicionaram-se 100 μL da suspensão contendo cepas de leishmania e nas linhas E, F, G e H mais 100 μL de meio 199, (Figura 4). As placas foram incubadas a 28°C por 24 e 48 horas. Para a avaliação da viabilidade celular foi utilizado o teste colorimétrico da Resazurina (SIGMA-ALDRICH, EUA). Após cada período de incubação, foram adicionadas 20 μL de Resazurina à 1,5 mM e incubadas em câmara de CO_2 entre 5 e 10%. A leitura da absorbância foi realizada em leitor de microplacas (TP-READER NM-THERMO PLATE) com comprimento de onda de 550 nm (SIFAOU, et al., 2014).

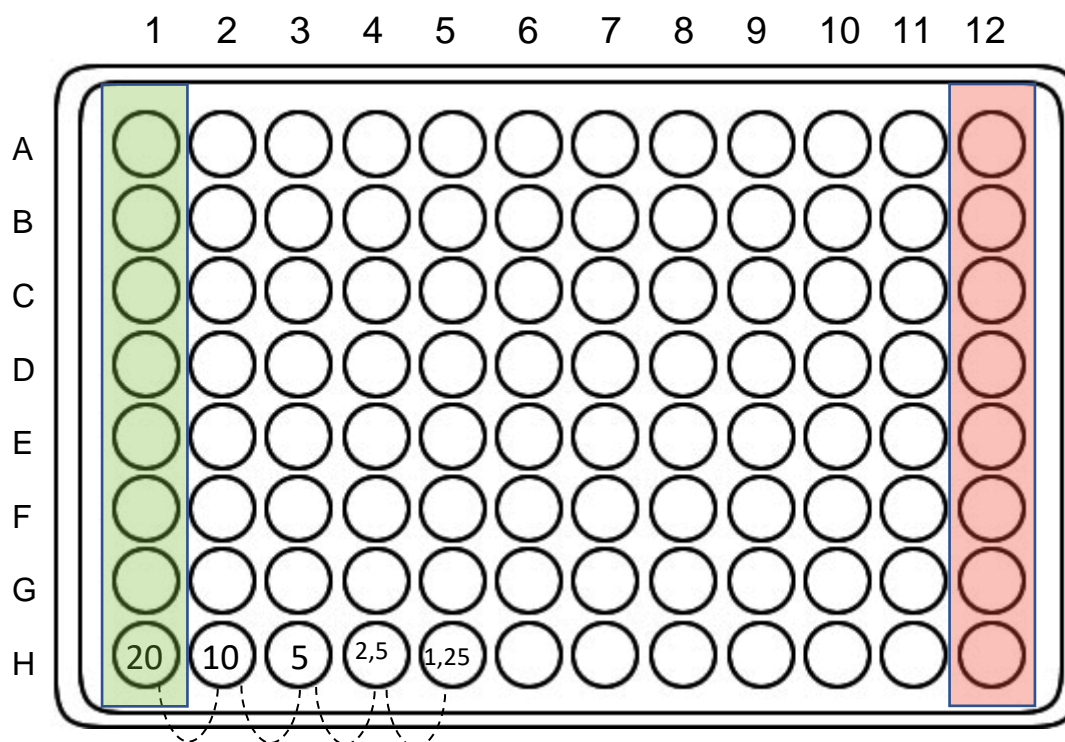


Figura 4: Placa de 96 poços representativa do teste de Leishmania. A coluna 1 em verde representa a adição de 100 μL do composto a ser testado, o qual foi submetido a diluição seriada como mostra os números em cada poço da linha H; A coluna 12 em vermelho representa os poços de controle negativo onde adicionou-se apenas 100 μL de meio 199 e 100 μL da suspensão contendo cepas de Leishmania, nas linhas de A à D, sendo as demais linhas o branco do teste.

3.8 Ensaio de citotoxicidade dos caldos fermentados

Foram avaliadas nesse ensaio a citotoxicidade do cultivo simples de *P. polymyxa* e do cultivo misto *P. polymyxa* + *S. aureus*, o qual apresentou-se como o melhor dos cultivos mistos testados.

As linhagens celulares utilizadas para tal ensaio foram: fibroblastos HDFn, cultivados em *Minimum Essential Medium Eagle* (α -MEM) e queratinócitos HaCat, cultivados em *Gibco Roswell Park Memorial Institute medium* (RPMI) respectivamente. Ambas linhagens celulares são pertencentes ao Laboratório de Inflamação e Doenças Infecciosas – LIDI.

Linhagens celulares foram plaqueadas em placas de 96 poços, contendo 2×10^4 células/poço em 200 μL de meio α -MEM ou RPMI e cultivadas durante 24 horas ou até que as mesmas aderissem ao fundo do poço, a 37 $^{\circ}\text{C}$ em estufa com 5% de CO_2 . Após a adesão das células ao fundo do poço, o meio foi

descartado e os poços foram lavados com PBS. Realizada a lavagem, foram então adicionados 100 μL do meio selecionado para cada célula (sem fenol) e mais 100 μL de diferentes concentrações do caldo fermentado previamente diluído em meio correspondente. As concentrações utilizadas para esse ensaio foram: 10000 $\mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$, 5000 $\mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$, 2500 $\mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$, 1250 $\mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$ e 625 $\mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$. Como controle negativo (C-) foi utilizado apenas meio de cultura e como controle positivo (C+) foi utilizado extrato 5%. As placas foram incubadas no período de 24, 48 e 72 horas nas condições previamente estabelecidas.

Após atingidos cada um dos tempos de incubação, foi retirado uma alíquota para realização de outros testes. Então 15 μL (10% do volume final do poço) de (5000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de MTT + meio de cultura incompleto) foram adicionados nas placas, estas foram incubadas por 4 horas. Os cristais de formazan formados foram solubilizados com 100 μL de Dimetilsulfóxido (DMSO), homogeneizados e então todo o volume final do poço foi transferido para outra placa, assim evitando a interferência das bolhas durante a leitura. A absorbância foi medida em um espectrofotômetro de placa (TPReader NM-Thermo Plate) a 570 nm. A porcentagem da viabilidade celular foi calculada com a absorbância de células não tratadas (controle negativo) representando 100% da viabilidade celular. Foram realizados três experimentos independentes em quadruplicada.

3.9 Migração celular

O ensaio consiste em criar um risco no fundo de um poço contendo cultura celular e mensurar a taxa de migração das células. Para tal, foram utilizadas placas de cultura de 48 poços (Kasvi, BR) e as células foram plaqueadas em uma concentração de 3×10^5 células/poço. Após 48 horas de incubação a (37 °C, 5% de CO_2) nas células aderidas ao fundo do poço, foi realizado um risco no sentido vertical com o auxílio de uma ponteira de pipeta P200. O meio de cultura foi aspirado e foi colocado 1 mL de solução de *Phosphate Buffered Saline* (PBS) para lavar e eliminar resquícios de células que foram desprendidas durante a confecção da ranhura. O PBS foi desprezado e foram adicionados 500 μL de meio e 500 μL dos compostos testados, totalizando um volume final de 1 mL por poço. Foram testadas as seguintes concentrações: 10000, 5000, 2500, 1250 e 625 $\mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$. A partir deste momento, as placas foram

levadas ao microscópio invertido com uma câmera fotográfica acoplada. Para a linhagem celular HDFn as imagens foram capturadas no primeiro período que foi denominado tempo 0, após foram capturadas as imagens de 6 em 6 horas até se estabelecer 24 horas, após esse período também foram capturadas imagens em 48 e 72 horas. Já para a linhagem celular HaCat, as imagens foram realizadas no tempo 0 e de 8 em 8 horas até atingir as primeiras 24 horas. Após esse período também foram feitas as imagens nos tempos de 48 e 72 horas.

Para o ensaio de migração utilizando a linhagem celular HaCat, foi estabelecido um intervalo maior na captura das imagens devido ao seu crescimento ser mais lento comparado a linhagem de HDFn.

3.10 Ação antitumoral dos caldos fermentados

As células HepG2 / C3A são hepatomas do fígado humano, sendo amplamente utilizadas em estudos *in vitro* como modelos para avaliar a citotoxicidade, mutagenicidade e genotoxicidade de diferentes compostos químicos (WESTERINK; SCHOONEN, 2007a, 2007b). Células HepG2/C3A, pertencentes ao Laboratório de Inflamação e Doenças infecciosas - LIDI foram cultivadas em meio RPMI suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino (LGC Biotechnology), 1% de Penicilina/ Estreptomicina (Sigma-Aldrich Brazil Ltda), em garrafa T25 para cultura celular. As células foram mantidas em estufa úmida à 37 °C com 5% de CO₂. A citotoxicidade *in vitro* dos compostos estudados em relação a linhagem celular citada, foi avaliada conforme metodologia adaptada da ISO 10993-5(ISO10993-5, 2009) e descrita por Neamark et al. (2007), utilizando método de redução do (MTT- [3- (4, 5-dimetiltiazol-2-il) 2, 5-difeniltetrazolium bromide] -Sigma-Aldrich, EUA), como já descrito na sessão 3.8, também nos tempos de 24, 48 e 72 horas.

3.11 Análise estatística

Os dados foram analisados quanto à sua normalidade e homoscedasticidade por meio dos testes de Shapiro Wilk e Levene, respectivamente. Após a definição do tipo de amostra analisada (paramétrica ou não paramétrica), os resultados foram comparados por meio de análises de variância (ANOVA *one way* ou análises não paramétricas). Uma vez identificadas diferenças significativas, aplicou-se o post hoc de Tukey (para

amostras paramétricas) e Teste de Dunn's (para amostras não paramétricas). O limite de significância estatística adotado foi $p \leq 0.05$.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Cultivo misto e avaliação antimicrobiana

O caldo fermentado obtido a partir de cepas de *P. polymyxa* já teve sua ação comprovada contra cepas potencialmente patogênicas (CAVICCHIOLI, 2017; SERRANO, 2014). Então no presente estudo avaliou-se a atividade da mesma quando cultivada em cultivo misto a partir de *Paenibacillus polymyxa* e as cepas indutoras *S. aureus*, *E. coli*, *C. albicans*, *C. paradoxa* e *M. paradoxa*

Em relação aos testes de triagem utilizando a metodologia de difusão em ágar, os halos apresentados tiveram as médias de 12,7 mm contra *S. aureus*; 12 mm contra *E. coli* e não se obteve halos de inibição contra *C. albicans*. (CAVICCHIOLI, 2017)

No presente estudo, quando o mesmo microrganismo foi cultivado em cultivo misto os halos de inibição foram maiores, demonstrando até 20 mm contra *S. aureus*, 13 mm contra *E.coli* e 14 mm contra *C. albicans* (Figura 5).

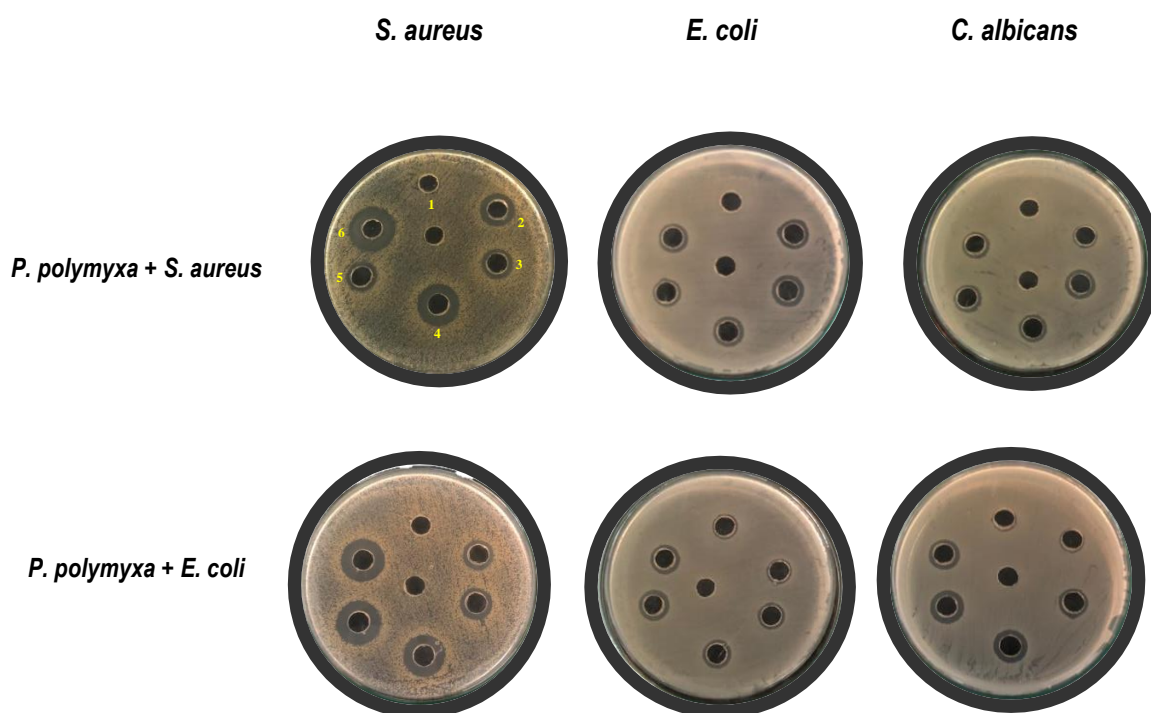




Figura 5: Ensaio de atividade antimicrobiana utilizando os caldos fermentados a partir de diferentes cultivos mistos. Cada poço representa um diferente tempo de fermentação do caldo. Onde: (1) 24 horas, (2) 48 horas, (3) 72 horas, (4) 96 horas, (5) 144 horas e (6) 168 horas.

Com base nos dados obtidos o tempo onde se estabeleceram os maiores halos, foi de 168 horas para ambos cultivos mistos testados (Figura 6), assim o tempo de fermentação do caldo obtido nos cultivos mistos foi padronizado em 168 horas para realização das próximas etapas. Se tratando da diferença de eficácia entre os três diferentes cultivos mistos testados, não houve diferença significativa em relação a atividade antimicrobiana dos caldos frente as cepas testes, pois optamos em utilizar de uma metodologia qualitativa para triagem da atividade, ambos os caldos demonstraram aplicabilidade para utilização como promissor agente de atividade inibitória antimicrobiana.

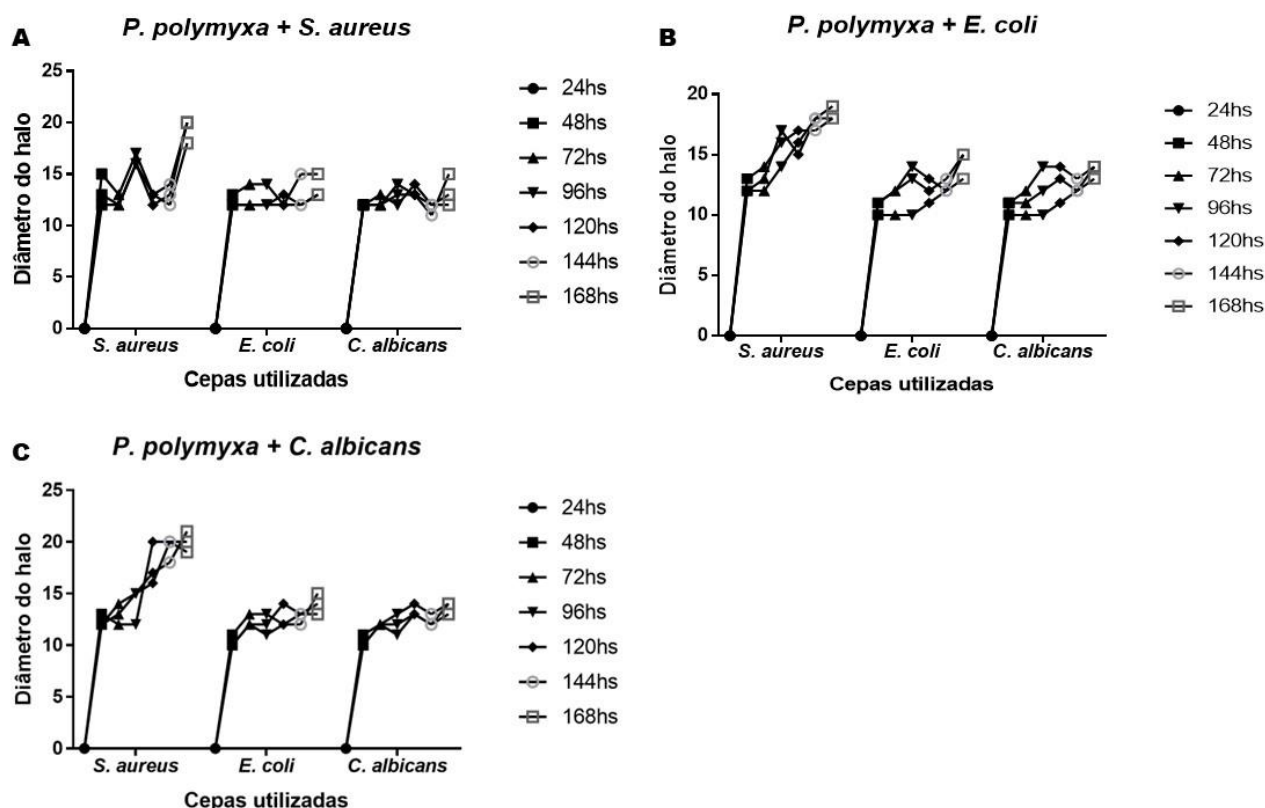


Figura 6: Atividade antimicrobiana dos três diferentes cultivos mistos frente as cepas testes previamente selecionadas, nos tempos de 24, 48, 72, 96, 120, 144 e 168 horas. (A) Cultivo misto obtido a partir da fermentação de *P. polymyxa* mais *S. aureus*; (B) Cultivo misto obtido a partir da fermentação de *P. polymyxa* mais *E. coli*; (C) Cultivo misto obtido a partir da fermentação de *P. polymyxa* mais *C. albicans*.

Levando em consideração que a fase estacionária de cepas de *P. polymyxa* se dá em 48 horas e que a obtenção dos maiores halos de inibição se deu em 168 horas, podemos propor que mesmo após ter se obtido o fim da fase estacionária, os metabólitos ali presentes, de forma ainda não estabelecida, aumentam seu potencial de ação contra microrganismos potencialmente patogênicos.

A biossíntese do antibiótico pestalona pelo fungo *Pestalotia* sp., é um exemplo de indução da expressão de uma rota biosintética em resposta ao cultivo misto com bactéria marinha unicelular (CUETO et al., 2001). A partir de uma mistura de microrganismos originários de sedimentos marinhos foi isolada a plocianina, um pigmento azul com atividade antibiótica que não havia sido detectado em culturas puras. Foi verificado ainda que a produção de pequenas moléculas pela linhagem indutora não é suficiente para ativar a produção do

composto, sugerindo que a indução necessita de contato célula-célula, ou mecanismos mais complexos, como a constante troca de metabólitos entre os microrganismos (ANGELL et al., 2006). Estes e outros dados encontrados na literatura reforçam a ideia de que o cultivo misto pode influenciar na produção de metabólitos secundários.

Em estudo sobre modulação de atividade antibacteriana a partir de caldos fermentados obtidos por actinomicetos marinhos em cultivo misto com bactérias patogênicas, foi observado um aumento da atividade antimicrobiana contra *E. coli* e *S. aureus*, em três dos quatro cultivos mistos testados, sendo que um dos isolados teve um aumento de 100% da atividade inibitória contra *S. aureus*, demonstrando assim a maior eficiência do cultivo misto em relação ao cultivo simples (HAQUE et al., 2015). Devido aos dados aqui expressos, foi observada a necessidade da realização do teste de concentração inibitória mínima para que se comprove estatisticamente a diferença entre a produção de metabólitos a partir do cultivo simples e do cultivo misto, assim como entre os cultivos mistos.

4.2 Determinação da CIM e CBM

Os resultados obtidos em ensaios de microdiluição das concentrações dos caldos fermentados obtidos por cultivo simples, assim como por cultivo misto, foram representados em gráficos de inibição do crescimento microbiano, onde cada figura representa os dados obtidos para a inibição de crescimento de tipos diferentes de patógenos humanos.

Ao comparar as concentrações testadas com o controle, podemos afirmar que houve inibição em todas elas, sendo que em alguns casos, iguais ou próximas a inibição dos antibióticos, Penicilina e Estreptomicina, que foram utilizados na concentração de 2500 $\mu\text{g/mL}^{-1}$. Além disso observa-se que de forma geral a atividade antimicrobiana é maior quando analisados os dados obtidos de cultivo misto em todas as situações, mesmo que variando o tipo de cultivo.

Ao analisarmos a inibição do crescimento microbiano obtida contra cepas de *E. coli* (Figura 7), nota-se que o cultivo misto de *P. polymyxa* com *S. aureus* manteve-se estável até a menor concentração testada (1250 $\mu\text{g/mL}^{-1}$). Quando testada a concentração de 625 $\mu\text{g/mL}^{-1}$ pode-se afirmar que a concentração

inibitória mínima do mesmo é a concentração de $1250 \mu\text{g/mL}^{-1}$. Em todas as situações o cultivo misto mostrou uma ação maior quando comparada a ação estabelecida a partir do cultivo simples de *P. polymyxa* e nitidamente pode-se afirmar que o cultivo misto com *S. aureus* demonstrou ser o mais promissor na produção de metabólitos com ação antimicrobiana contra *E. coli*, apresentando uma inibição do crescimento microbiano de 92,86% tratando-se da concentração de $1025 \mu\text{g/mL}^{-1}$, enquanto o cultivo simples de *P. polymyxa* apresentou uma inibição de 18,58% nessa mesma concentração.

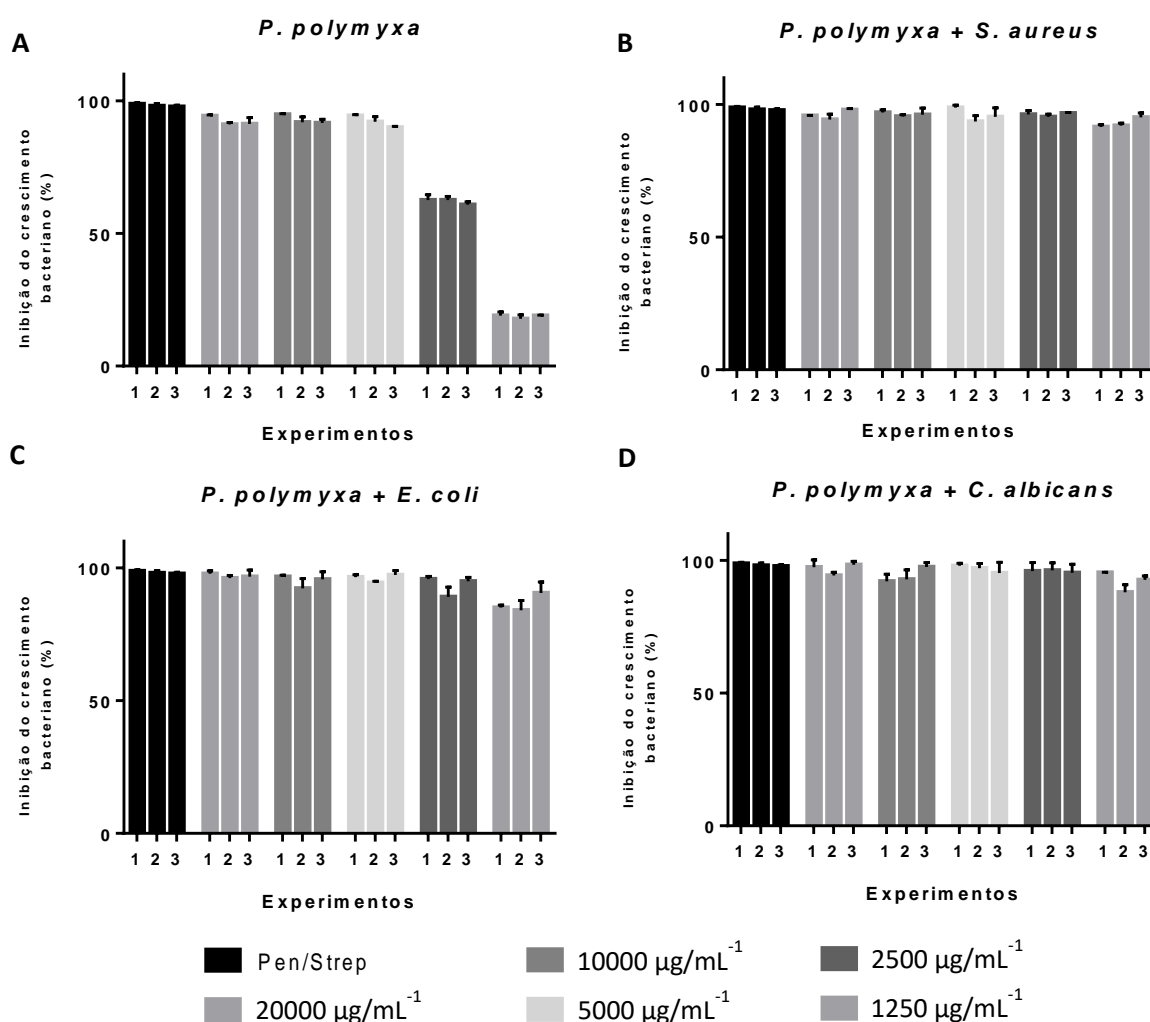


Figura 7: Porcentagem de inibição do crescimento de *E.coli* nas concentrações de (20000, 10000, 5000, 2500 e $1250 \mu\text{g/mL}^{-1}$) dos caldos fermentados obtidos por cultivos simples e mistos após liofilização. Onde: (A) Cultivo simples de *P. polymyxa*; (B) Cultivo misto de *P. polymyxa* com *S. aureus*; (C) Cultivo misto de *P. polymyxa* com *E. coli*; (D) Cultivo misto de *P. polymyxa* com *C. albicans*. As barras 1, 2 e 3 representam 3 diferentes experimentos.

Se tratando de cepas de *P. aeruginosa* (Figura 8) o cultivo misto de *P. polymyxa* com *S. aureus* e o de *P. polymyxa* com *C. albicans* mantiveram-se estáveis até a menor concentração testada ($1250 \mu\text{g/mL}^{-1}$). Quando testada a concentração de $625 \mu\text{g/mL}^{-1}$ também pode-se afirmar que a concentração inibitória mínima dos mesmos é a concentração de $1250 \mu\text{g/mL}^{-1}$. Os cultivos mistos de *P. polymyxa* com *S. aureus* e *P. polymyxa* com *C. albicans* apresentaram uma inibição de 95,86% e 92,29% respectivamente na concentração de $1250 \mu\text{g/mL}^{-1}$, enquanto o cultivo simples de *P. polymyxa* apresentou uma inibição de 10,55% nessa mesma concentração.

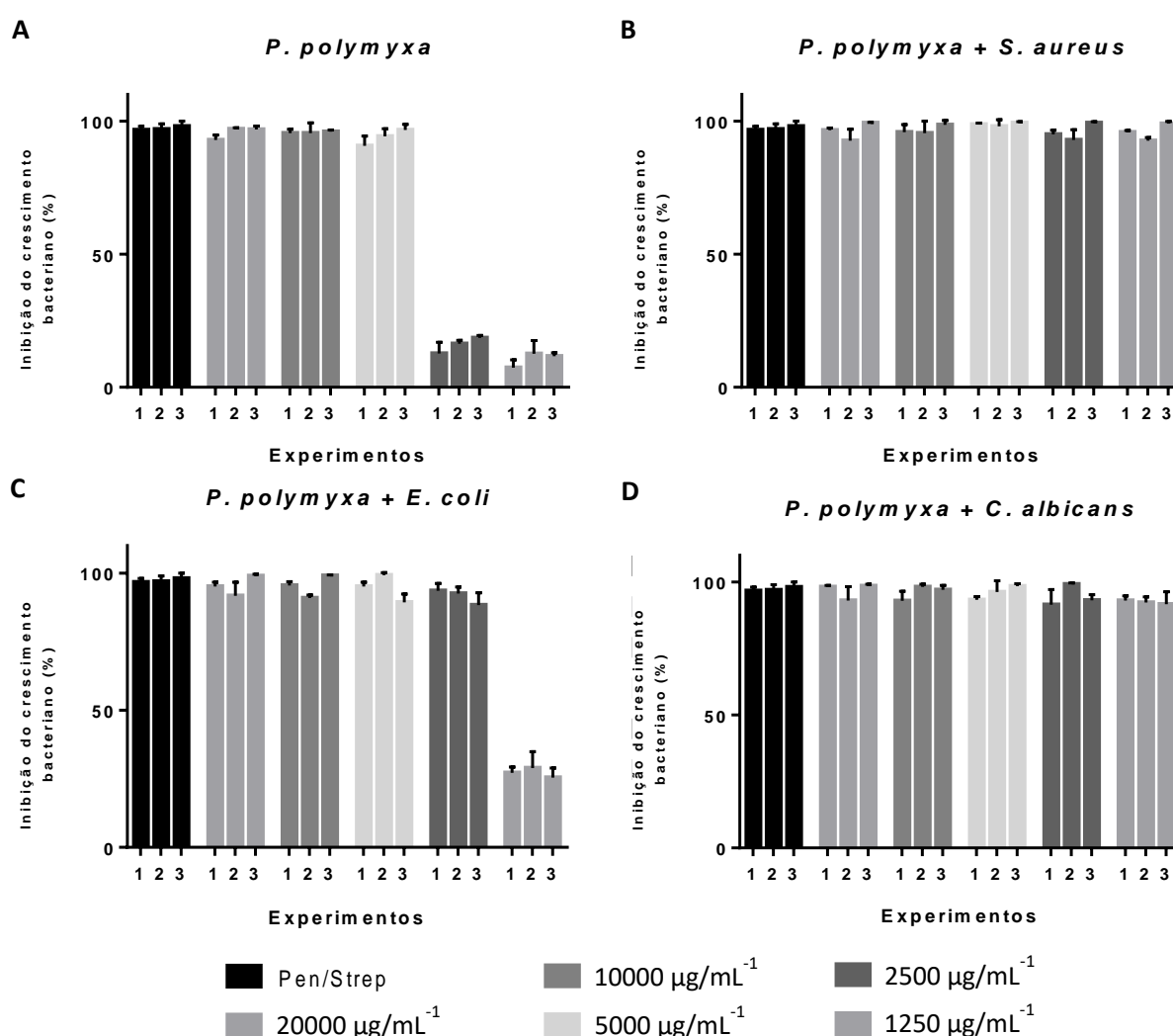


Figura 8: Porcentagem de inibição do crescimento de *Pseudomonas aeruginosa* nas concentrações de (20000, 10000, 5000, 2500 e $1250 \mu\text{g/mL}^{-1}$) dos caldos de fermentação obtidos por cultivos simples e mistos após liofilização. Onde: (A) Cultivo simples de *P. polymyxa*; (B) Cultivo misto de *P. polymyxa* com *S. aureus*; (C) Cultivo misto de *P. polymyxa* com *E. coli*; (D) Cultivo misto de *P. polymyxa* com *C. albicans*.

Embora a maioria das cepas de *E. coli* sejam comensais inofensivas, há um subconjunto que adquiriu a capacidade de causar doenças intestinais ou extra intestinais. As cepas patogênicas extra intestinais de *E. coli* (ExPEC) causam diversas infecções fora do trato intestinal em humanos e animais (MELLATA, 2013; STROMBERG et al., 2017). Tendo como base o hospedeiro e o local da infecção, as diferentes cepas de ExPEC são subclassificadas como: meningite neonatal *E. coli* (NMEC), *E. coli* associada à sepse (SEPEC) e *E. coli* uropatogênica (UPEC). Nos Estados Unidos, os custos associados às infecções por ExPEC em seres humanos e aves ultrapassam 4 bilhões de dólares ao ano (MELLATA, 2013; RUSSO; JOHNSON, 2003; STROMBERG et al., 2017).

Em um estudo onde foi isolado o endofítico *Aspergillus versicolor* a partir de raízes da espécie vegetal, *Pulicaria crispa* Forssk, originários da Arábia Saudita, foi realizada a separação e caracterização estrutural do caldo fermentado, evidenciando então, dois novos derivados de éter diário, aspergilleteres A e B, além de cinco metabólitos conhecidos. Avaliando a atividade antimicrobiana desses novos metabólitos, constatou-se que os mesmos mostraram um poderoso potencial na inibição de *S. aureus*, *B. cereus* e *E. coli*, apresentando valores de CIM de $4,3 \mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$ para *S. aureus*, $3,7 \mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$ para *B. cereus* e $3,9 \mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$ para *E. coli*, quando utilizado aspergilleter A; e $6,1 \mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$ para *S. aureus*, $4,8 \mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$ para *B. cereus* e $5,1 \mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$ para *E. coli*, quando utilizado aspergilleter B. Porém é importante citar que tais valores foram obtidos com a substância já purificada. Os presentes compostos não apresentaram atividade inibitória contra *P. aeruginosa* (MOHAMED; IBRAHIM; ASFOUR, 2020).

Um outro estudo teve como objetivo investigar as propriedades antibacterianas do óleo essencial obtido das folhas de *Baccharis coridifolia* contra cepas multirresistentes, usando o método de microdiluição para determinar a CIM. Os resultados revelaram que esta substância possui atividade antibacteriana contra cepas de *P. aeruginosa* ($512 \mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$) e *S. aureus* ($128 \mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$), mas não contra *E. coli*.

A bactéria *P. aeruginosa* é frequentemente resistente a muitas classes de antibióticos e agentes terapêuticos, o que a torna um problema durante a

infecção, pois em muitos casos pode ser difícil o tratamento. Esta é frequentemente denominada patógeno "oportunista" devido ao fato de raramente infectar indivíduos saudáveis. Clinicamente, o risco primário é para os pacientes que apresentam algum tipo de comprometimento do sistema imunológico, incluindo aqueles com fibrose cística (FC), câncer, HIV, dispositivos médicos residenciais, queimaduras, lesões oculares e feridas diabéticas não cicatrizantes (DIGGLE; WHITELEY, 2020). Este microrganismo é capaz de causar doenças em uma grande variedade de hospedeiros, incluindo entre eles: plantas, nematóides, insetos e mamíferos (ELBORN, 2016).

Um grande problema relatado na infecção por *P. aeruginosa* é o seu alto grau de resistência a alguns antibióticos de amplo espectro, que o fazem crescer em diferentes ambientes desafiadores (FRIERI; KUMAR; BOUTIN, 2017). A infecção do pé diabético é uma das principais complicações do diabetes, levando à hospitalização e amputações de membros inferiores, essas infecções são geralmente poli microbianas e são capazes de gerar lesões teciduais graves, estas, por sua vez, estão frequentemente associadas à invasão de feridas por *P. aeruginosa* (AZIZ et al., 2019). Assim a alta eficácia do caldo fermentado produzido a partir de *P. polymyxa* em cultivo misto com *S. aureus* ou *C. albicans*, mesmo nas menores concentrações, eleva o potencial do mesmo, o tornando um agente promissor para possível elaboração de cremes ou géis de uso tópico com atividade antimicrobiana.

Em estudo envolvendo pacientes com pé diabético, foi demonstrado que dos 386 pacientes, 350 (91%) pacientes apresentavam várias infecções bacterianas e fúngicas. Cepas de *P. aeruginosa* foi um dos principais agentes patogênicos isolados, presentes em 80 isolados (28,1%) do total de patógenos isolados. Esses isolados foram resistentes a diferentes grupos de antibióticos, como gentamicina, cefotaxima, coamoxiclav, tazobactam e meropenem. A atividade antimicrobiana da Protamina, um polipeptídeo catiônico bem conhecido por sua atividade bactericida, derivado do esperma de peixes do tipo salmão, foi avaliada contra cepas de *P. aeruginosa* obtidas em infecções de pés diabéticos. Foram registrados valores de CIM para *P. aeruginosa* de $500\mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$ de protamina (AZIZ et al., 2019). No presente estudo a CIM encontrada foi de $1250\mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$, porém essa concentração se deu no caldo fermentado total, tendo

oportunidade de se tornar mais eficaz se isolado o composto responsável pela atividade. Ainda assim, o caldo fermentado pode ser utilizado em sua totalidade quando para elaboração de antimicrobianos para uso tópico.

Outro microrganismo de grande importância para saúde pública são as salmonelas, tendo também grande necessidade de produtos com ação antimicrobiana contra estas. A carne de aves e os ovos contaminados estão entre os veículos alimentares mais frequentemente implicados pelas salmonelas. As infecções por salmonelas causam perdas economicamente significativas para os produtores de aves em muitos países além de absorverem grandes investimentos de recursos governamentais produtos com e privados para testes e controles (GAST; PORTER, 2020). Assim ação antimicrobiana que evitem tais contaminações são de grande importância para o mercado alimentício.

As doenças humanas resultantes do consumo de produtos de origem avícolas contaminados por salmonelas podem ser um grande prejuízo para a indústria, governos e indivíduos afetados. Os custos totais combinados de assistência médica, perda de produtividade e mortes prematuras resultantes de infecções por salmonelas transmitidas por alimentos em humanos nos Estados Unidos foram estimados entre 4 a 11 bilhões de dólares por ano (SCHARFF, 2012). Mais de 70% das infecções humanas por salmonelas nos Estados Unidos estão ligadas ao consumo de frango, peru ou ovos contaminados (GUO et al., 2011). Ainda cepas de *Salmonella sp.* resistente a antimicrobianos de importância médica, incluindo cefalosporinas e fluoroquinolonas, foram consideradas pelo Centro de Controle e Prevenção de Doenças (CDC) como uma séria ameaça à saúde pública, pois são muitas vezes mais graves e apresentam maiores taxas de hospitalização (CDC, 2019).

Para os testes de inibição da *S. setubal* (Figura 9) o cultivo simples de *P. polymyxa* exibiu uma inibição de 15,11% em sua menor concentração, enquanto os cultivos mistos estabelecidos com *S. aureus*, *E. coli* e *C. albicans* apresentaram uma inibição de até 87,01%, 91,13% e 81,51% respectivamente também em sua menor concentração (1250 µg/mL⁻¹). O CIM para essa cepa se estabeleceu em 2500 µg/mL⁻¹.

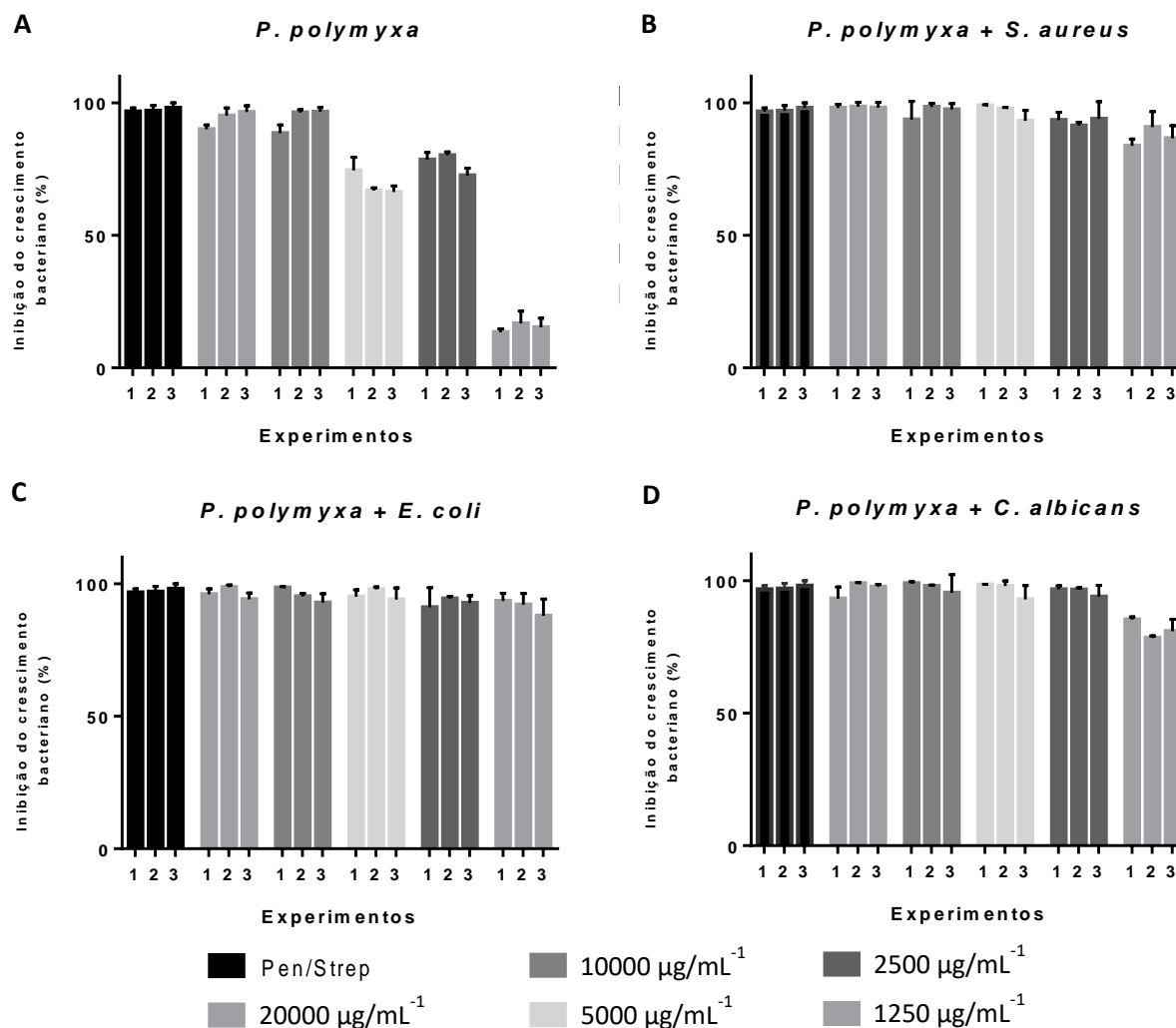


Figura 9: Porcentagem de inibição do crescimento de *Salmonella setubal* nas concentrações de (20000, 10000, 5000, 2500 e 1250 $\mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$) dos caldos fermentados obtidos por cultivos simples e mistos após liofilização. Onde: (A) Cultivo simples de *P. polymyxa*; ; (B) Cultivo misto de *P. polymyxa* com *S. aureus*; (C) Cultivo misto de *P. polymyxa* com *E. coli*; (D) Cultivo misto de *P. polymyxa* com *C. albicans*.

Um estudo avaliando a concentração inibitória mínima de óleos essenciais extraídos de rizomas de açafrão (*Curcuma longa* L.) e gengibre (*Zingiber officinale* Roscoe) frente a 14 diferentes cepas de salmonelas entéricas isoladas de frango resfriado, demonstrou que o óleo essencial de gengibre foi expressivamente mais eficaz do que o óleo de açafrão, apresentando uma concentração inibitória mínima de 2500 a 5000 $\mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$ dependendo da cepa testada (MAJOLO et al., 2014). Um segundo estudo $\mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$ teve como objetivo investigar a atividade antimicrobiana de um extrato hidroalcolólico obtido a partir de sementes de linho, frente aos patógenos *Salmonella typhimurium* (ATCC 14028) e *Salmonella typhi* (ATCC 9298), onde foi determinado que a

concentração inibitória mínima é de $5000 \mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$ para ambos os microrganismos analisados (LEÓN; FREIRE; VILLAVICENCIO, 2020). Estes dados corroboram com os apresentados no presente estudo, o qual identificou a CIM em $2500 \mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$ quando se tratando de cepas de *Salmonella setubal*. O caldo apresentando tal atividade, pode ser futuramente utilizado, não somente, como um fármaco, antibiótico, mas também para elaboração de produtos de lavagem e prevenção de infecções em alimentos de origem animal.

Para os testes de inibição de *Staphylococcus aureus*, (Figura 10) o cultivo simples de *P. polymyxa* exibiu uma inibição de 4,49% em sua concentração de $1250 \mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$, e uma inibição de 59,13% na concentração de $2500 \mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$, enquanto os cultivos mistos estabelecidos com *P. polymyxa* mais *S. aureus* apresentaram inibições de 44,79% e 62,28% nas concentrações de $1250 \mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$ e $2500 \mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$ respectivamente. O cultivo misto de *P. polymyxa* mais *E.coli*, foi o mais eficaz contra cepas de *S. aureus*, apresentando uma inibição de 51,78% na concentração de $1250 \mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$ e 82,50% na concentração de $2500 \mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$, sua CIM ficou estabelecida em $5000 \mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$, onde observou-se uma inibição de 87,08%.

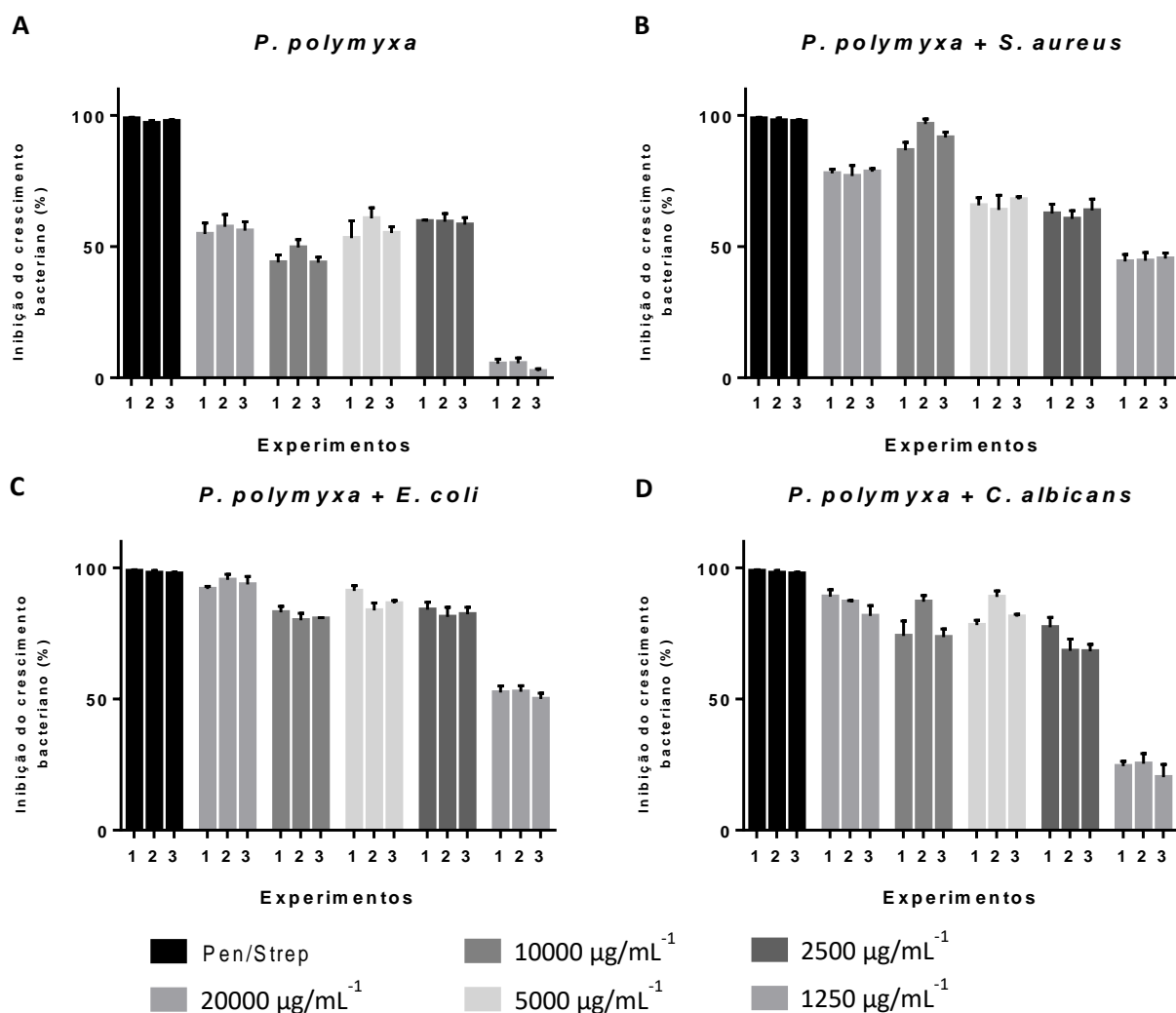


Figura 10: Porcentagem de inibição do crescimento de *S. aureus* nas concentrações de (20000, 10000, 5000, 2500 e 1250 $\mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$) dos caldos fermentados obtidos por cultivos simples e mistos após liofilização. Onde: (A) Cultivo simples de *P. polymyxa*; ; (B) Cultivo misto de *P. polymyxa* com *S. aureus*; (C) Cultivo misto de *P. polymyxa* com *E. coli*; (D) Cultivo misto de *P. polymyxa* com *C. albicans*.

Para os testes de inibição de *Staphylococcus epidermidis*, (Figura 11) o cultivo simples de *P. polymyxa* exibiu uma inibição de 22,36% em sua concentração de 1250 $\mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$, e uma inibição de 42,21% na concentração de 2500 $\mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$, enquanto os cultivos mistos estabelecidos com *P. polymyxa* mais *S. aureus* apresentaram inibições de 37,16%; 65,06% e 89,56% nas concentrações de 1250 $\mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$, 2500 $\mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$ e 5000 $\mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$ respectivamente, sendo este cultivo misto o mais eficaz apresentando sua CIM em 5000 $\mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$. O cultivo misto de *P. polymyxa* mais *E. coli*, apresentou inibições de 49,05% e 54,05% nas concentrações de 1250 $\mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$ e 2500 $\mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$. O cultivo misto

produzido com *C. albicans*, não apresentou diferença significativa do cultivo puro.

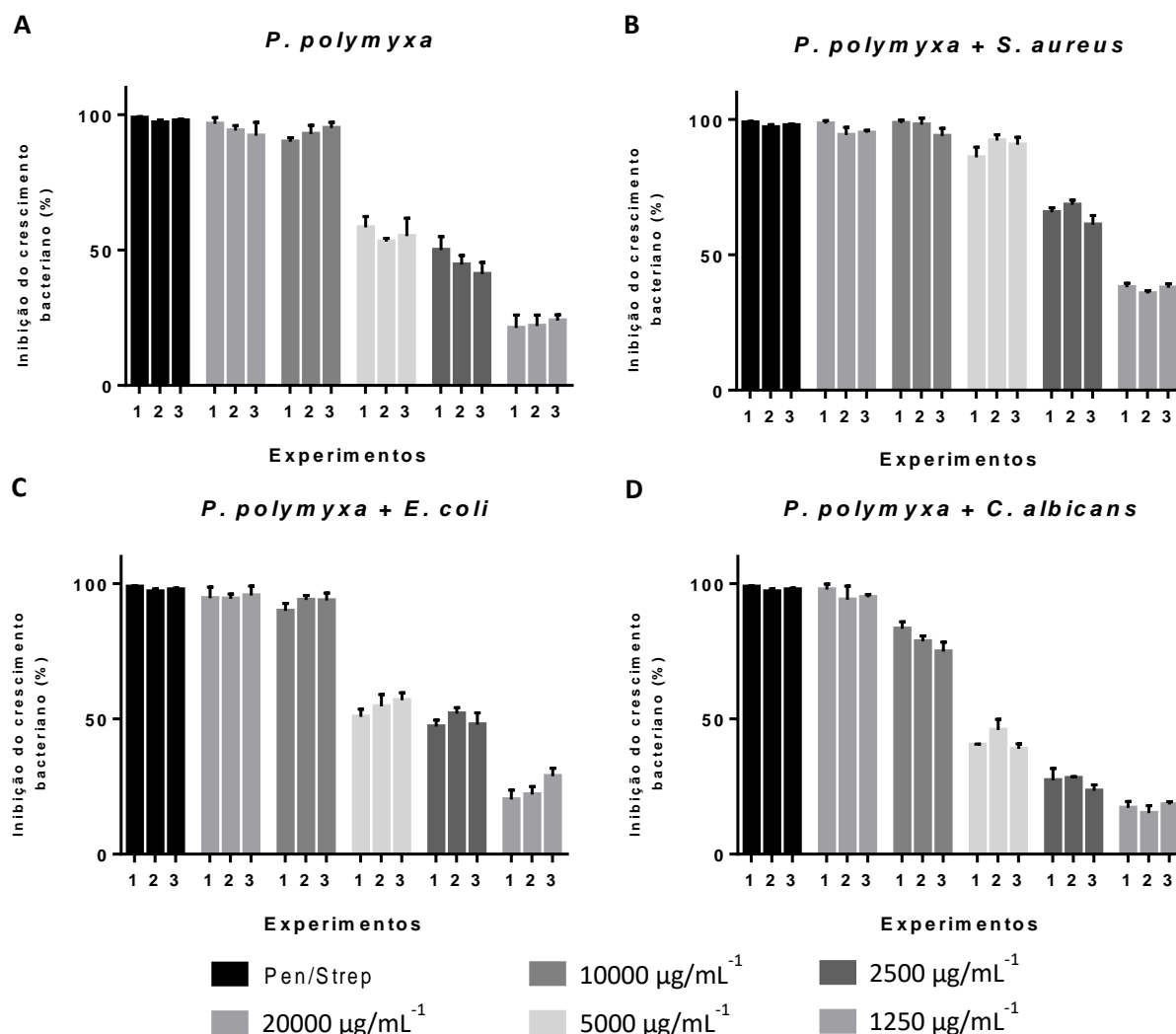


Figura 11: Porcentagem de inibição do crescimento de *S. epidermidis* nas concentrações de (20000, 10000, 5000, 2500 e 1250 $\mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$) dos caldos fermentados obtidos por cultivos simples e mistos após liofilização. Onde: (A) Cultivo simples de *P. polymyxa*; ; (B) Cultivo misto de *P. polymyxa* com *S. aureus*; (C) Cultivo misto de *P. polymyxa* com *E. coli*; (D) Cultivo misto de *P. polymyxa* com *C. albicans*.

Para os testes de inibição de *Staphylococcus saprophyticus* (Figura 12), o cultivo simples de *P. polymyxa* exibiu uma inibição de 36,61% em sua concentração de 1250 $\mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$, e uma inibição de 40,24% na concentração de 2500 $\mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$, enquanto os cultivos mistos estabelecidos com *P. polymyxa* mais *S. aureus* apresentaram inibições de 40,82%; 73,96 % e 84,92,% nas concentrações de 1250, 2500 e 5000 $\mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$, respectivamente. O cultivo misto de *P. polymyxa* mais *E.coli*, apresentou inibições de 76,08% e 80,63% nas

concentrações de 1250 e 2500 $\mu\text{g/mL}^{-1}$. O cultivo misto produzido com *C. albicans* apresentou inibições de 75,72% e 86,36% nas concentrações de 1250 e 2500 $\mu\text{g/mL}^{-1}$. Os cultivos mistos com *E. coli* e *C. albicans* apresentaram resultados semelhantes e ambos apresentaram uma CIM de 2500 $\mu\text{g/mL}^{-1}$, porém pode-se relatar que o caldo fermentado por *P. polymyxa* mais *C. albicans* foi o caldo mais promissor na inibição de *S. saprophyticus*.

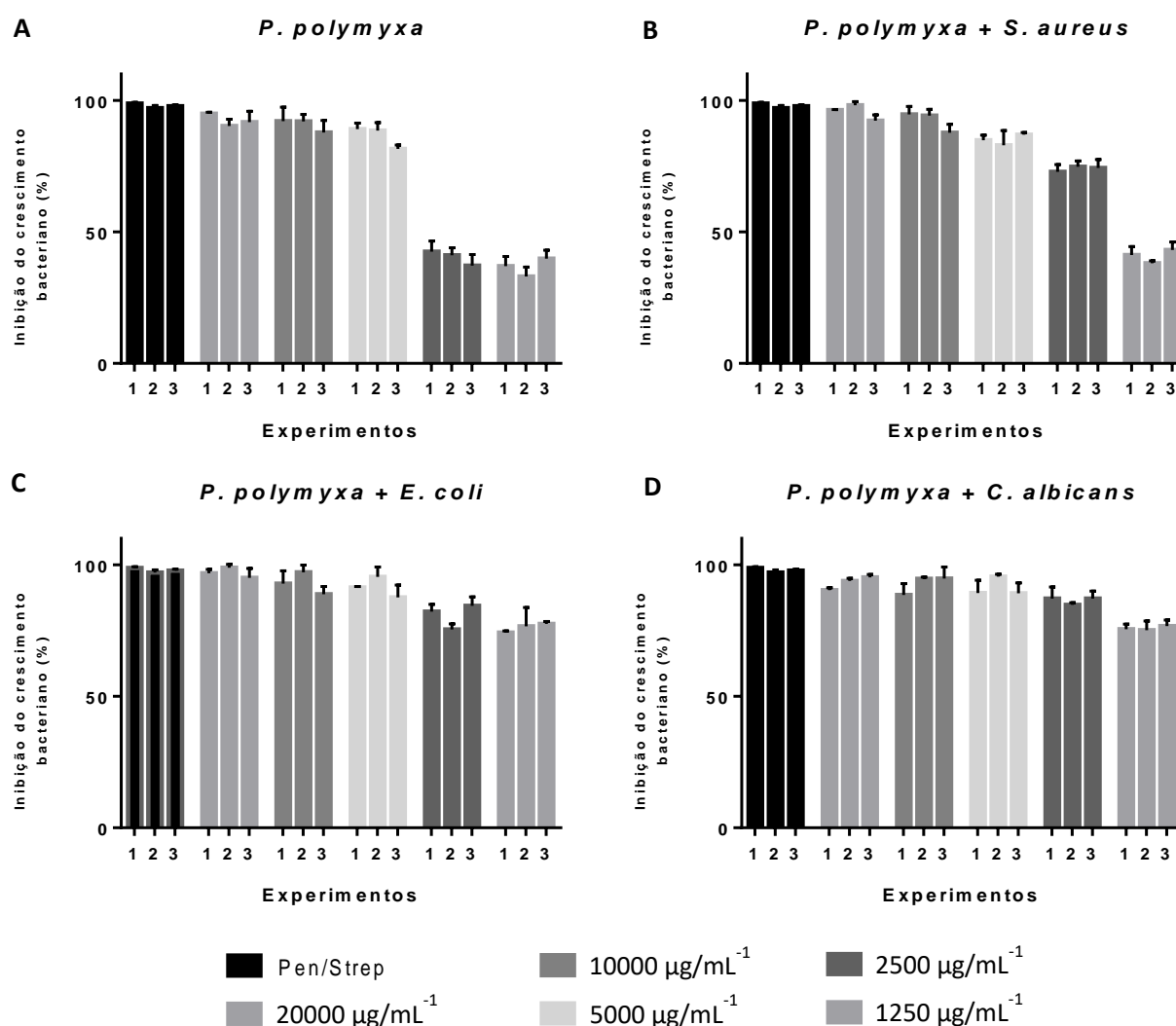


Figura 12: Porcentagem de inibição do crescimento de *S. saprophyticus* nas concentrações de (20000, 10000, 5000, 2500 e 1250 $\mu\text{g/mL}^{-1}$) dos caldos fermentados obtidos por cultivos simples e mistos após liofilização. Onde: (A) Cultivo simples de *P. polymyxa*; ; (B) Cultivo misto de *P. polymyxa* com *S. aureus*; (C) Cultivo misto de *P. polymyxa* com *E. coli*; (D) Cultivo misto de *P. polymyxa* com *C. albicans*.

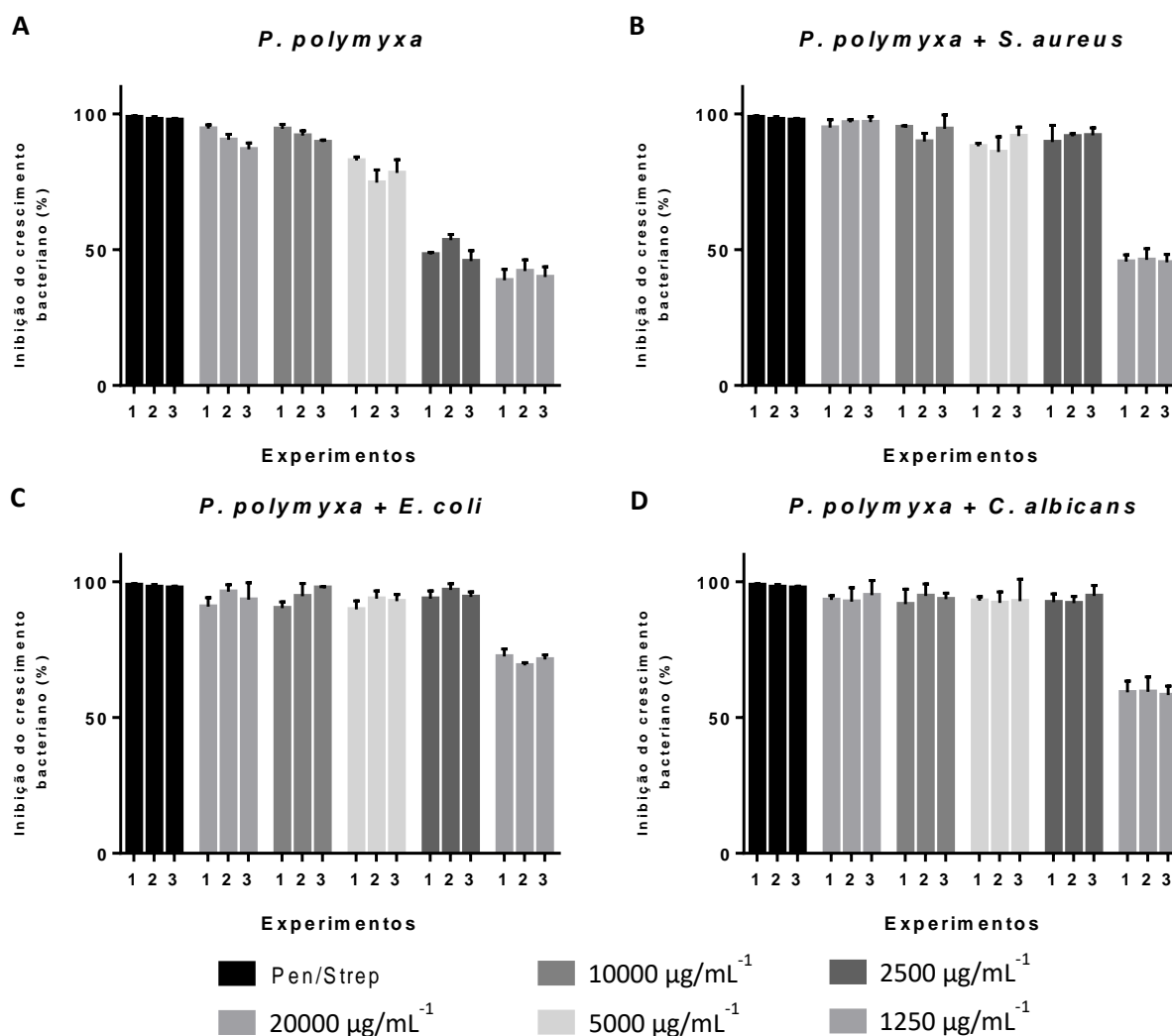


Figura 13: Porcentagem de inibição do crescimento de *M. luteus* nas concentrações de (20000, 10000, 5000, 2500 e 1250 µg/mL⁻¹) dos caldos fermentados obtidos por cultivos simples e mistos após liofilização. Onde: (A) Cultivo simples de *P. polymyxa*; ; (B) Cultivo misto de *P. polymyxa* com *S. aureus*; (C) Cultivo misto de *P. polymyxa* com *E. coli*; (D) Cultivo misto de *P. polymyxa* com *C. albicans*.

Para os testes de inibição do *Micrococcus luteus* (Figura 13), o cultivo simples de *P. polymyxa* exibiu uma inibição de 49,16% e 40,25% nas concentrações de 2500 e 1250 µg/mL⁻¹, respectivamente, enquanto os cultivos mistos estabelecidos com *S. aureus*, *E. coli* e *C. albicans* apresentaram uma inibição de 91,13%; 95,03%; 93,08%; respectivamente em 2500 µg/mL⁻¹ e 45,7%; 70,99% e 58,98% na concentração de 1250 µg/mL⁻¹. Assim sendo, o caldo fermentado de *P. polymyxa* mais *E. coli* foi o que apresentou melhor índice de inibição contra *M. luteus*, estabelecendo uma CIM de 2500 µg/mL⁻¹.

Para os testes de inibição do *Bacillus subtilis* (Figura 14), o cultivo simples de *P. polymyxa* exibiu uma inibição de 52,96 e 46,15% nas concentrações de 2500 e 1250 $\mu\text{g/mL}^{-1}$, respectivamente. O cultivo misto estabelecido com *S. aureus*, foi o que apresentou melhor inibição para *B. subtilis*, estabelecendo uma inibição de 92,72 e 82,75% nas mesmas concentrações apresentadas acima, sua CIM foi considerada a concentração de 2500 $\mu\text{g/mL}^{-1}$.

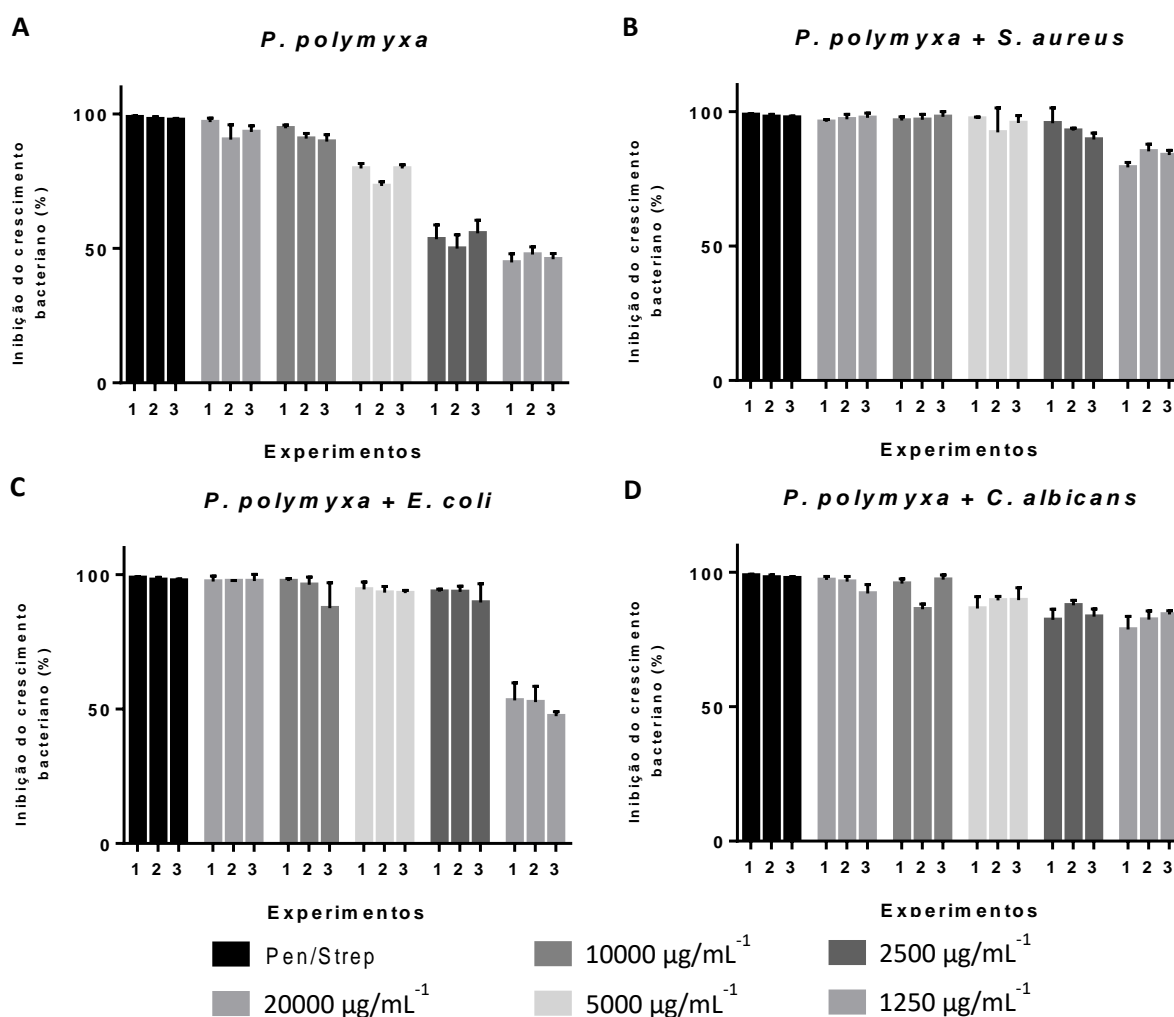


Figura 14: Porcentagem de inibição do crescimento de *Bacillus subtilis* nas concentrações de (20000, 10000, 5000, 2500 e 1250 $\mu\text{g/mL}^{-1}$) dos caldos fermentados obtidos por cultivos simples e mistos após liofilização. Onde: (A) Cultivo simples de *P. polymyxa*; ; (B) Cultivo misto de *P. polymyxa* com *S. aureus*; (C) Cultivo misto de *P. polymyxa* com *E. coli*; (D) Cultivo misto de *P. polymyxa* com *C. albicans*.

Algumas cepas de bactérias GRAM-positivas não são necessariamente consideradas como grandes patógenos, porém, estas estão cada vez mais

sendo relatadas como patógenos oportunistas, os quais agravam quadros clínicos de pacientes comprometidos com algum outro tipo de enfermidade. Novos patógenos, como o SARS-CoV2, que podem coexistir com uma ampla gama de bactérias, incluindo cepas multirresistentes, constituem uma ameaça à vida real para os humanos. Além disso, a resistência microbiana aos antibióticos no tratamento da pneumonia bacteriana é um problema generalizado que só tem aumentado (MARTÍ et al., 2021). Analisando então o atual quadro, há uma necessidade de obtermos antibióticos que eliminem a infecção bacteriana com eficácia, uma vez em que o risco de contaminação em pacientes internados com SARS-CoV2 é alto, podendo agravar drasticamente o quadro clínico do paciente. Para essa questão o caldo fermentado produzido em cultivo misto apresentado nesse estudo, apresenta grande potencial para elaboração de antibióticos ou ainda, agente desinfetante de uso hospitalar.

O *Staphylococcus aureus* é um gênero de bactéria GRAM-positiva que faz parte da microbiota humana, porém estes são capazes de causar diversas enfermidades, abrangendo desde uma simples infecção como os casos de espinhas e furúnculos, até as mais graves como, por exemplo, endocardite, meningite, pneumonia, septicemia entre outras. Em nós, seres humanos, são as bactérias mais frequentemente relatadas, o que facilita em grande escala a disseminação de infecções (ALMEIDA et al., 2016). Outro fator relevante é o de que a sua fácil aquisição de genes responsáveis por potencializar seus fatores de patogenicidade os tornam um grande problema de saúde pública (SOUZA; ALMEIDA; MARTINS, 2017). Por serem classificados como um dos principais agentes patogênicos causadores de enfermidades ligadas aos animais e humanos, a busca por novas opções para o controle do seu desenvolvimento utilizando métodos alternativos tem grande importância (FREITAS; FELIPE; COELHO, 2021).

Staphylococcus epidermidis é um membro comum da microbiota humana, sendo encontrado nas membranas mucosas e na pele. O *S. epidermidis* é capaz de estabelecer uma relação comensal ao longo da vida com seu hospedeiro. Porém estes podem exibir altas taxas de resistência a antibióticos de relevância clínica (MORGENSTERN et al., 2016). Atualmente, com a grande gama de aparelhos médicos implantados como próteses de articulações e também com o aumento do uso de equipamentos invasivos como sondas e respiradores

mecânicos, o *S. epidermidis* emerge como um importante patógeno oportunista (BRESCÓ et al., 2017). Assim como as cepas de *S. saprophyticus*, *M. luteus* e *B. subtilis*.

Outro grande problema relacionado ao gênero *Staphylococcus* e também mais comumente associado a bactérias GRAM-positivas é a conjuntivite bacteriana, que é um tipo comum de conjuntivite infecciosa e afeta todas as faixas etárias. Essa doença é causada por inflamação da conjuntiva através de uma ou mais espécies bacterianas resultando na formação de pus. A infecção bacteriana pode ocorrer devido à exposição a bactérias externas ou ainda por bactérias da própria microbiota, causando infecção ocular grave, pois estas podem afetar diretamente a córnea e causar a perda da visão (MULUYE et al., 2014). Os patógenos que estão mais associados a conjuntivites são *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, dentre outros, variando de acordo com cada região (UNG et al., 2020). Um estudo conduzido por (MOHAMED et al., 2020) na região do Egito, coletou amostras de 52 pacientes diagnosticados com infecção ocular para posterior identificação dos agentes causadores. Dentre os 52 isolados, identificou-se 7 como pertencentes a espécie *S. aureus* e 14 pertencentes a espécie *S. epidermidis* que, por sua vez, mostraram suscetibilidade a antibióticos tópicos, como fluoroquinolonas.

Um estudo utilizando fungos endofíticos isolados da espécie vegetal *Taxus wallichiana*, avaliou a capacidade antimicrobiana destes, utilizando dos caldos fermentados a uma concentração de 20 mg/mL⁻¹. A atividade antimicrobiana de três extratos fúngicos foram avaliados em três cepas, sendo duas bactérias GRAM-positivas - *Staphylococcus aureus* (ATCC 12600) e *Bacillus subtilis* (ATCC 6633), e uma GRAM-negativa: *Escherichia coli* (ATCC 25922). O teste de CIM foi realizado utilizando dois dos fungos com melhores resultados apenas para cepas de *E. coli*, apresentando uma CIM de 250 µg/mL⁻¹ para ambos os extratos (GAUCHAN et al., 2020).

Após a determinação da CIM, as alíquotas foram retiradas para a realização da CBM. Os valores de CIM e CBM de cada caldo fermentado estão expressos na (Tabela 2). A CBM foi considerada a concentração que após plaqueada em ágar não apresentou nenhum crescimento celular.

Tabela 2: Valores da CIM e da CBM para cada uma das cepas testadas neste estudo. A sigla PpSa foi utilizada para o caldo fermentado de *P. polymyxa* mais *S. aureus*, PpEc para *P. polymyxa* mais *E. coli* e PpCa para *P. polymyxa* mais *C. albicans*

Bactéria	CIM $\mu\text{g/mL}^{-1}$	CBM $\mu\text{g/mL}^{-1}$	Cultivo misto
<i>B. subtilis</i>	2500	5000	PpSa
<i>E. coli</i>	1250	2500	PpSa
<i>M. luteus</i>	2500	10000	PpEc
<i>P. aeruginosa</i>	1250	2500	PpSa
<i>S. aureus</i>	5000	20000	PpEc
<i>S. epidermidis</i>	5000	20000	PpSa
<i>S. saprophyticus</i>	2500	10000	PpCa
<i>S. setubal</i>	2500	20000	PpEc

4.3 Tempo de morte – *Time kill test*

O *time kill test* é utilizado para determinar o tempo em que o composto testado leva para impedir o crescimento do microrganismo. Ele fornece a dinâmica de ação desta substância e sua interação com o tempo (ELIOPOULOS; ELIOPOULOS, 1988). No presente estudo foi realizado o teste de *Time kill* utilizando o caldo fermentado obtido a partir de *P. polymyxa* mais *S. aureus* sobre as bactérias *E. coli* (Figura 15), e *P. aeruginosa* (Figura 16). Além de utilizar as duas cepas GRAM-negativas citadas, também se utilizou do caldo fermentado de *P. polymyxa* mais *C. albicans* contra a bactéria *S. saprophyticus* (Figura 17), com o intuito de estudar o tempo de morte em bactéria GRAM-positiva. As cepas e os caldos utilizados para esse experimento, foram selecionados devido a apresentarem os melhores resultados obtidos nos testes de CIM e CBM.

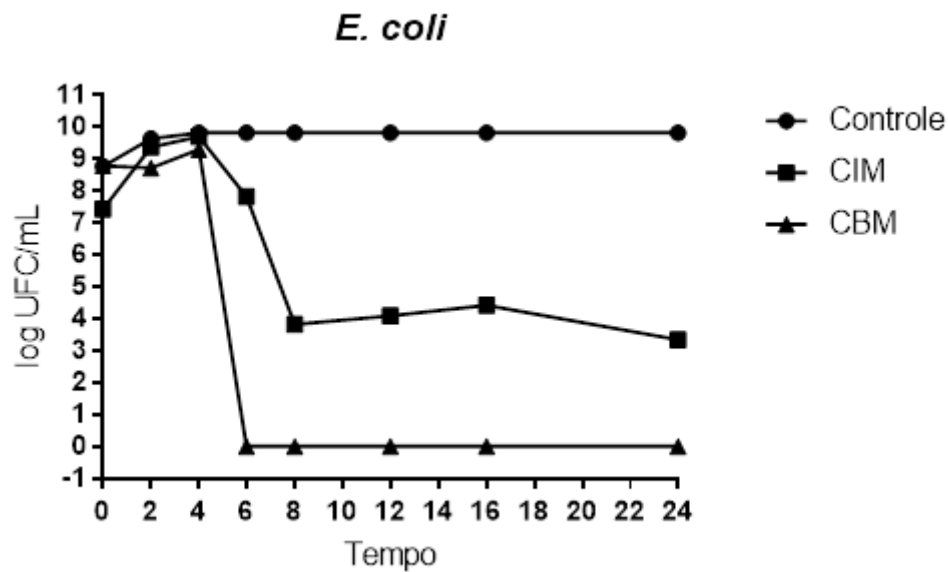


Figura 15: Tempo de morte de cepas de *E. coli* frente ao tratamento com o caldo fermentado misto de *P. polymyxa* mais *S. aureus*. O valor da CIM utilizada foi de $1250 \mu\text{g/mL}^{-1}$ e para CBM foi de $2500 \mu\text{g/mL}^{-1}$.

Podemos observar o tempo de morte exato se tratando da *E. coli*, onde em 6 horas deu-se a queda total de seu crescimento quando utilizado a CBM, caindo também sua CIM primeiro em 6 horas e novamente em 8 horas onde manteve-se estável.

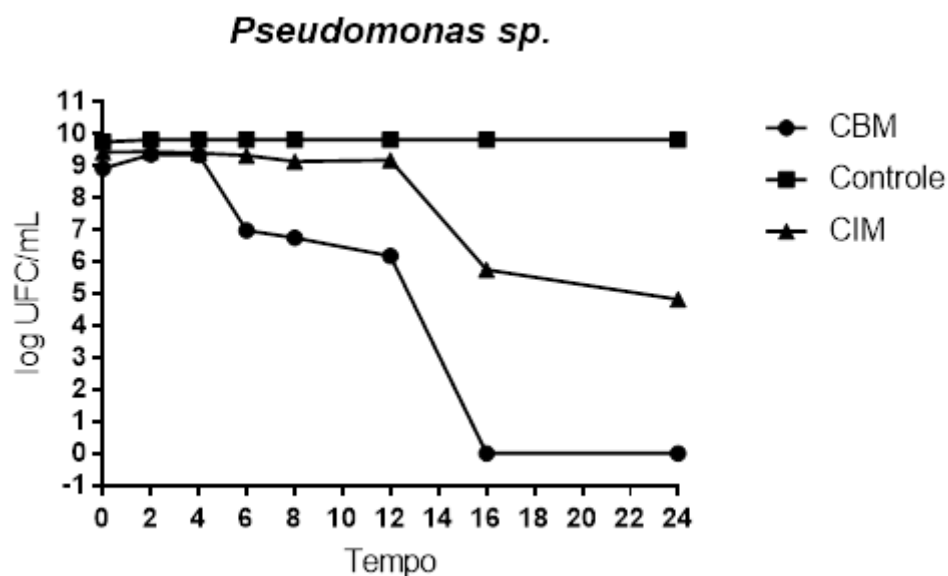


Figura 16: Tempo de morte de cepas de *P. aeruginosa* frente ao tratamento com o caldo fermentado misto de *P. polymyxa* mais *S. aureus*. O valor da CIM utilizada foi de $1250 \mu\text{g/mL}^{-1}$ e para CBM foi de $2500 \mu\text{g/mL}^{-1}$.

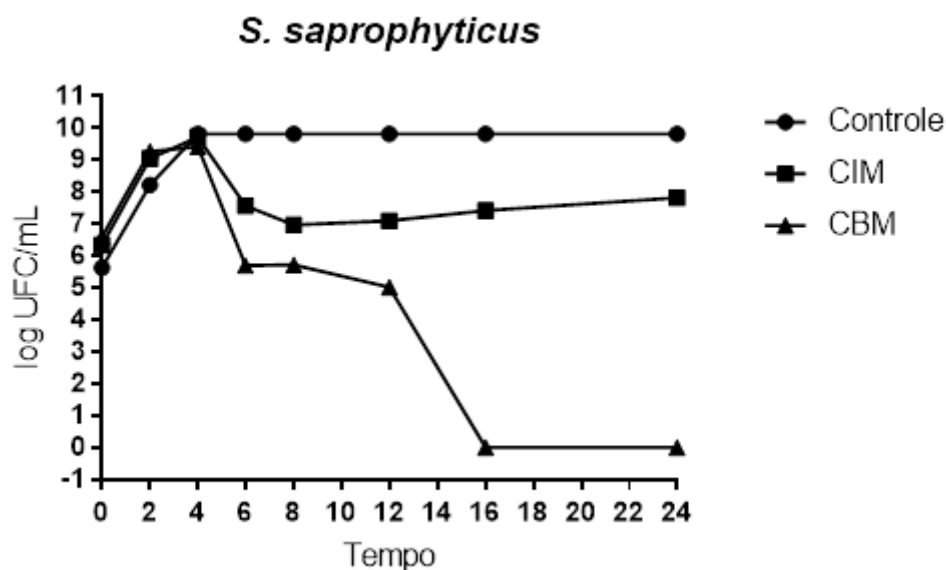


Figura 17: Tempo de morte de cepas de *S. saprophyticus* frente ao tratamento com o caldo fermentado misto de *P. polymyxa* mais *C. albicans*. O valor da CIM utilizado foi de $2500 \mu\text{g/mL}^{-1}$ e para CBM foi de $10000 \mu\text{g/mL}^{-1}$.

Para as cepas de *P. aeruginosa* e *S. saprophyticus*, observou-se um comportamento similar, onde a CBM tem um pico inicial de queda em 6 horas, após essa queda, continua a cair o número de UFC/mL discretamente, atingindo o log de 0 UFC/mL apenas após 16 horas do início do tratamento. Se tratando da CIM, para *P. aeruginosa* nota-se uma queda de UFC/mL após 12 e 16 horas. Já para *S. saprophyticus*, o log da UFC/mL cai até 8 horas e se mantém estável após esse período. Assim podemos afirmar que o caldo fermentado em questão é considerado bactericida após 6 horas para *E. coli* e após 16 horas para as demais cepas.

Perim e colaboradores (PERIM et al., 2019), testaram extratos de casca de *Davilla nitida* contra bactérias GRAM-positivas e GRAM-negativas estando dentre elas *E. coli*, *Pseudomonas spp.* e *S. saprophyticus*, que são as mesmas bactérias testadas em nosso estudo. Eles utilizaram a técnica de *time kill* para determinar o tempo de ação do extrato e obtiveram resultados promissores com uma redução significativamente rápida no log médio de quase todas as células viáveis. Para as GRAM-negativas houve uma queda do número de células a partir de 6 horas e uma grande redução na densidade celular com o extrato foi observado com *Proteus spp.*, *Pseudomonas spp.*, *Citrobacter youngae*, *E. coli*, *S. saprophyticus* e *S. aureus*. Após 12 horas demonstrou-se que o extrato de

Davilla nitida é altamente bactericida e estes resultados corroboram com os de nosso estudo, onde *E. coli* demonstrou uma queda significativa em 6 horas e *P. aeruginosa* e *S. saprophyticus* em 16 horas.

Um outro estudo conduzido por Appiah, Boakye e Agyare, (APPIAH; BOAKYE; AGYARE, 2017), investigou as propriedades antimicrobianas de extratos de metanol de *Trametes gibbosa*, *Trametes elegans*, *Schizophyllum commune* e *Volvariella volvacea* através de algumas técnicas e dentre elas a de *time kill*. Houve uma bactéria em comum entre os estudos, a *E. coli*. Os autores observaram que o curso da ação antimicrobiana dos extratos, demonstram comportamento bacteriostático, porém após um período, em média a partir da 24ª hora, houve um aumento gradual no número de células viáveis com todos os tipos de extratos testados. A partir disto, demonstramos a eficácia dos extratos de nossa pesquisa, pois em 6 horas houve uma grande redução no número de células viáveis de *E. coli* e elas não voltaram a crescer demonstrando novamente uma ação bactericida.

4.4 Atividade Leishmanicida

A atividade do caldo fermentado de *P. polymyxa* puro e os cultivos mistos foram testados nas concentrações de 20000; 10000; 5000; 2500 e 1250 $\mu\text{g/mL}^{-1}$ em promastigotas de *L. infantum chagasi* nos tempos de 24 e 48 horas, através da técnica de resazurina. Os resultados obtidos são demonstrados na (Figura 18), onde são expressos os gráficos com a porcentagem de morte nos tempos determinados.

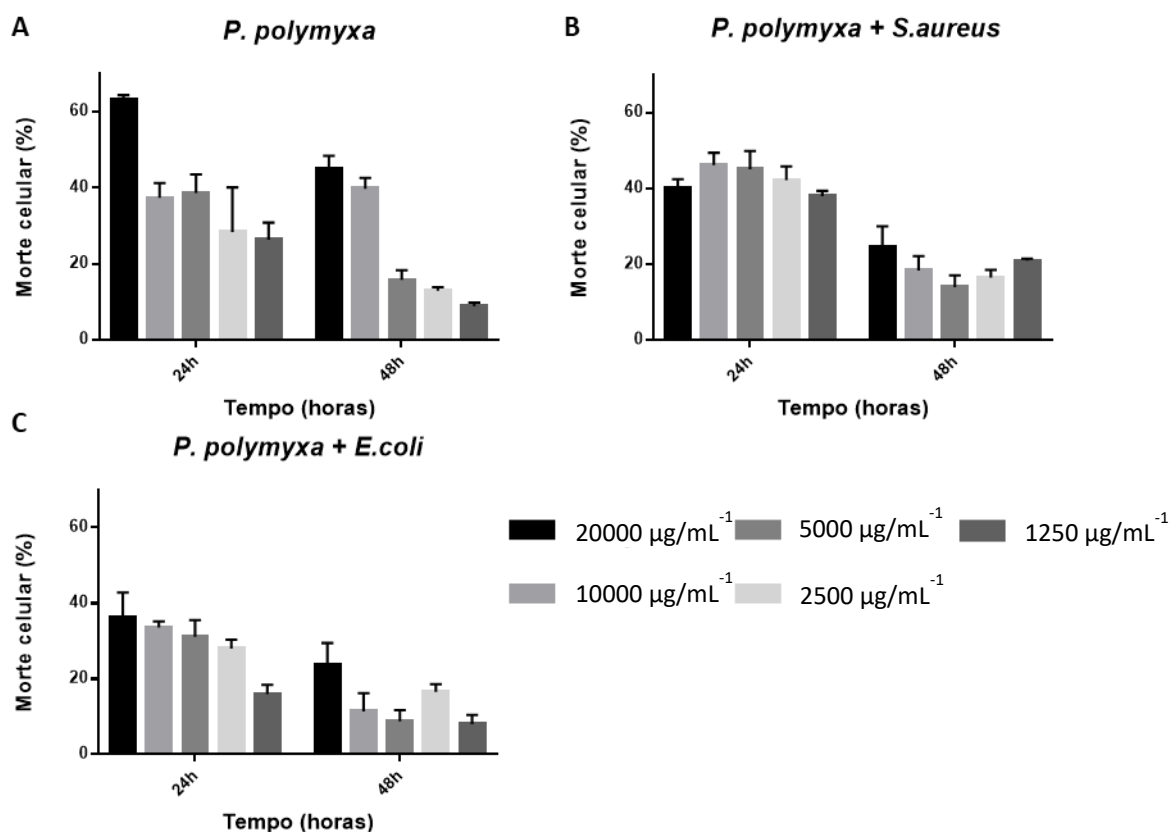


Figura 18: Mortalidade celular em diversas concentrações dos extratos obtidos do *P. polymyxa* contra os promastigotas de *L. infantum chagasi*. A) Extrato de *P. polymyxa*. B) Extrato obtido do cultivo misto *P. polymyxa* com *Staphylococcus aureus*. C) Extrato obtido do cultivo misto *P. polymyxa* com *Escherichia coli*. Os valores são expressos como média + D.P.

Os resultados demonstraram uma efetividade maior para o caldo fermentado puro se tratando da maior concentração testada, com porcentagem de morte de 63,31% nessa concentração e 26,32% na menor concentração em 24 horas. Já em 48 horas os resultados demonstraram uma queda em sua atividade com morte de 45,12% na maior concentração e 8,87% na menor concentração. Os caldos fermentados mistos foram menos eficientes se tratando apenas da maior concentração testada, porém quando avaliado o cultivo misto de *P. polymyxa* mais *S. aureus*, o mesmo se manteve estável mesmo quando em concentrações mais baixas, apresentando resultados melhores que o cultivo simples. Para o caldo fermentado estabelecido a partir de *P. polymyxa* mais *S. aureus*, foi constatado 46,16 e 42,17% de morte celular nas concentrações de 10000 e 2500 µg/mL⁻¹ em 24 horas. Enquanto que no cultivo simples, nas mesmas concentrações os valores de morte celular foram de 37,4 e 28,36%.

Uma vez em que na concentração de 10000 $\mu\text{g/mL}^{-1}$ os caldos fermentados apresentaram alta taxa de citotoxicidade contra células saudáveis humanas e as menores concentrações não foram tóxicas, pode-se afirmar que o cultivo misto teve um melhor desempenho na inibição de promastigotas de *L. infantum chagasi*, quando em concentrações de interesse.

Produtos naturais são uma fonte potencial de novos agentes terapêuticos contra as leishmanioses (BOSQUIROLI et al, 2017). Devido aos resultados promissores frente as bactérias potencialmente patogênicas, a toxicidade do extrato produzido pelo *P. polymyxa* e os cultivos mistos, foram testados sobre a *L. infantum chagasi* para avaliação de porcentagem de morte em 24 e 48 horas.

Neris e colaboradores em 2017 (NERIS et al, 2017), estudaram o caldo fermentado da bactéria *P. Polymyxa* RNC-D em *L. amazonensis* nos tempos de 24, 48 e 72 horas e observaram que nas concentrações mais altas testadas de 10 e 15 mg/ml^{-1} houve morte significativa do parasita e na concentração de 1 mg/ml^{-1} induziu a morte de 50% em 48 e 72 horas. Os resultados encontrados nesse caso demonstraram uma resposta mais eficaz no tratamento comparado aos resultados dos testes sobre a *L. infantum chagasi*, tanto para o caldo fermentado obtido por cultivo puro, quanto os cultivos mistos. Isso provavelmente acontece devido ao fator de virulência das linhagens de leishmania, sendo a *L. infantum chagasi* potencialmente mais virulenta.

A partir da revisão de literatura, observou-se uma grande maioria de estudos relacionados a extratos produzidos por fungos endofíticos, diferente do presente estudo que utiliza extratos de bactéria endofítica. Há estudos sobre a atividade leishmanicida, porém, referente a espécie *L. infantum chagasi* quase não foram encontrados dados.

Almeida e colaboradores em 2018 (ALMEIDA et al, 2018), descreveram a atividade leishmanicida de dois extratos brutos produzidos por cepas endofíticas de fungos pertencentes ao gênero *Bipolaris* de duas macrófitas aquáticas, *Eichhornia azurea* e *Eichhornia crassipes*. Os dois extratos foram eficazes contra *Leishmania amazonensis* com IC_{50} (Concentração Inibitória de 50%) de 70 $\mu\text{g/mL}^{-1}$ e 84 $\mu\text{g/mL}^{-1}$. Podemos observar que as concentrações do trabalho citado são mais eficazes quando comparadas as concentrações do extrato do *P. polymyxa* frente a *L. infantum chagasi*, porém os valores de IC_{50} do cultivo misto, ficaram próximos das concentrações de 10000 e 5000 $\mu\text{g/mL}^{-1}$, os quais

apresentaram baixa citotoxicidade para células humanas, como demonstrado logo a diante.

Outro estudo que demonstrou alguns resultados eficazes e outros sem efeito significativo foi feito por Nascimento et al (2015). O grupo estudou a atividade leishmanicida de fungos isolados de folhas da planta de *Vernantia polyanthes*. Foram produzidos dezesseis extratos para os testes com promastigotas de *L. amazonensis* e dentre eles, três mostraram-se mais eficazes apresentando valores de IC₅₀ de 59,5, 17,9 e 3,0 µg/mL⁻¹ (NASCIMENTO et al, 2015).

Os resultados menos expressivos demonstram que alguns extratos, tanto de fungos como de bactérias necessitam de uma concentração mais alta para produzirem algum efeito sobre o parasita. Um outro ponto a ser citado é a adequação do extrato através da pesquisa dos melhores meios de produção ou mesmo da concentração de seus componentes, ou seja, há a necessidade de um estudo mais específico e aprofundado referente a produção do caldo fermentado especificamente para analisar o efeito citotóxico sobre a *L. infantum chagasi*. Não foram encontrados dados na literatura sobre pesquisas com caldos mistos e seus efeitos citotóxicos em leishmanina.

4.5 Ensaio de Citotoxicidade

Os estudos de viabilidade celular *in vitro* são de grande importância quando se trata de avaliar a biocompatibilidade de materiais e extratos, estes comumente são requeridos antes do desenvolvimento de estudos *in vivo* e uso clínico. Dentre as células que participam do processo de cicatrização estão os queratinócitos que exercem um importante papel nesse processo atuando principalmente na contração e remodelação da ferida. Os fibroblastos, são células que também exercem papel fundamental na criação da matriz extracelular e de estruturas de colágeno responsáveis pelo suporte mecânico de outros tipos de células relacionados ao processo de regeneração do tecido lesado (SANTOS, 2018; SINGH; YOUNG; MCNAUGHT, 2017; WERNER; KRIEG; SMOLA, 2007). A citotoxicidade *in vitro* dos compostos estudados em relação às linhagens de células de fibroblastos dérmicos humanos neonatais (HDFn) e queratinócitos humano (HaCaT) foi avaliada conforme metodologia

adaptada da ISO 10993-5(ISO10993–5, 2009) e descrita por (Neamnark et al. 2007), utilizando método de redução do (MTT- [3- (4, 5-dimetiltiazol-2-il) 2, 5-difeniltetrazolium bromide] -Sigma-Aldrich, EUA).

A toxicidade celular dos caldos fermentados, simples e misto, foi testada nos tempos de 24, 48 e 72 horas nas seguintes concentrações (10000, 5000, 2500, 1250 e 625 $\mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$) (Figuras 19, 20 e 21). A capacidade das células, que permaneceram viáveis após o tratamento, em reduzir o sal do MTT foi avaliada pela formação de cristais de formazan, os quais foram posteriormente solubilizados em DMSO, assim proporcionando os valores de absorbância dos testes de MTT. O resultado obtido foi comparado ao controle negativo, como controle positivo para morte celular foi utilizado Extran 5%.

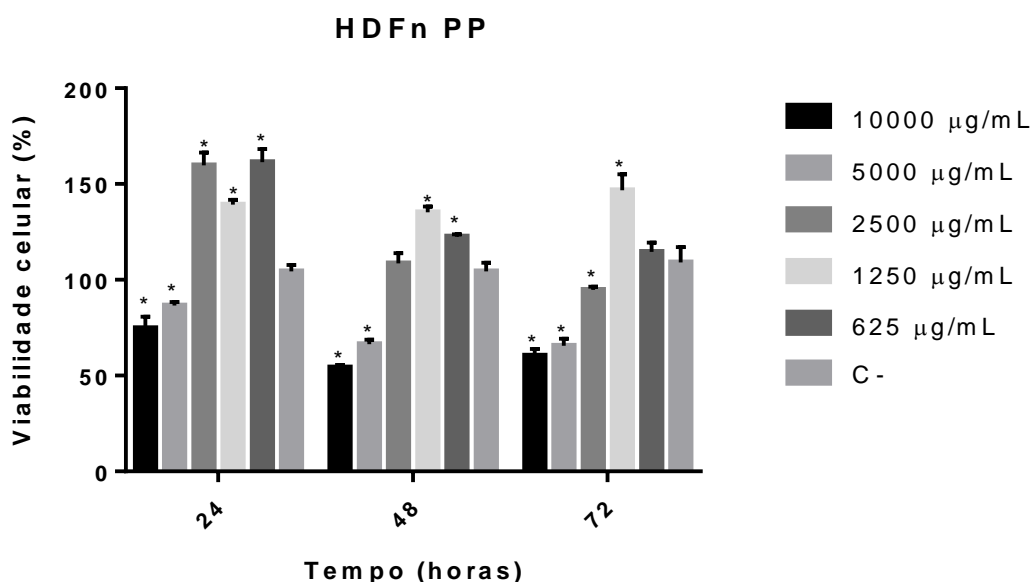


Figura 19: Viabilidade da linhagem HDFn frente ao caldo fermentado puro de *P. polymyxa* em diferentes concentrações, nos tempos de 24, 48 e 72 horas. Os valores são expressos como média + desvio padrão. * Significância estatística de $p \leq 0.05$.

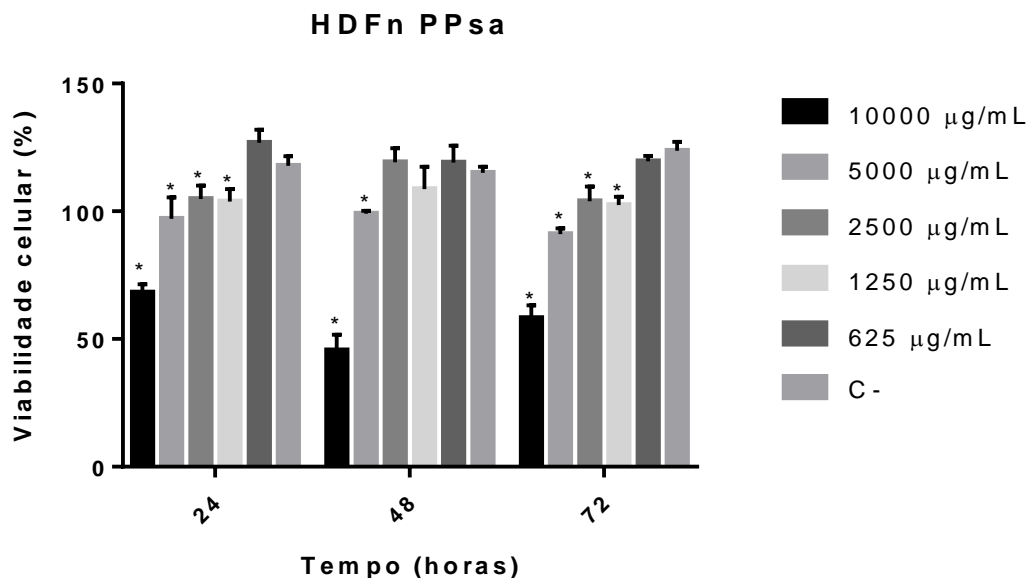


Figura 20: Viabilidade da linhagem HDFn frente ao caldo fermentado misto de *P. polymyxa* mais *S. aureus* em diferentes concentrações, nos tempos de 24, 48 e 72 horas. Os valores são expressos como média + desvio padrão. * Significância estatística de $p \leq 0.05$.

O caldo fermentado puro demonstrou ser tóxico a linhagem HDFn apenas nas concentrações de 10000 e 5000 $\mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$, sendo que o mesmo na concentração de 5000 $\mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$ apresentou alta viabilidade celular sendo tóxico apenas em 48 horas e 72 horas, mantendo-se em 86,59% de viabilidade em 24 horas, 66,49% em 48 horas e 65,52% em 72 horas. Na concentração de 2500 $\mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$ após o tratamento observou-se uma viabilidade celular de 94,70% em 72 horas, nos tempos de 24 e 48 horas a viabilidade manteve-se a cima de 100%, assim como nas concentrações menores a citada.

No caso do caldo fermentado misto, a concentração que demonstrou citotoxicidade frente a linhagem HDFn foi a de 10000 $\mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$, sendo que o mesmo nessa concentração apresentou baixa citotoxicidade em 24 horas, mantendo uma viabilidade celular de 68,18%. Nas concentrações abaixo de 10000 $\mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$ a viabilidade manteve-se a cima de 100%.

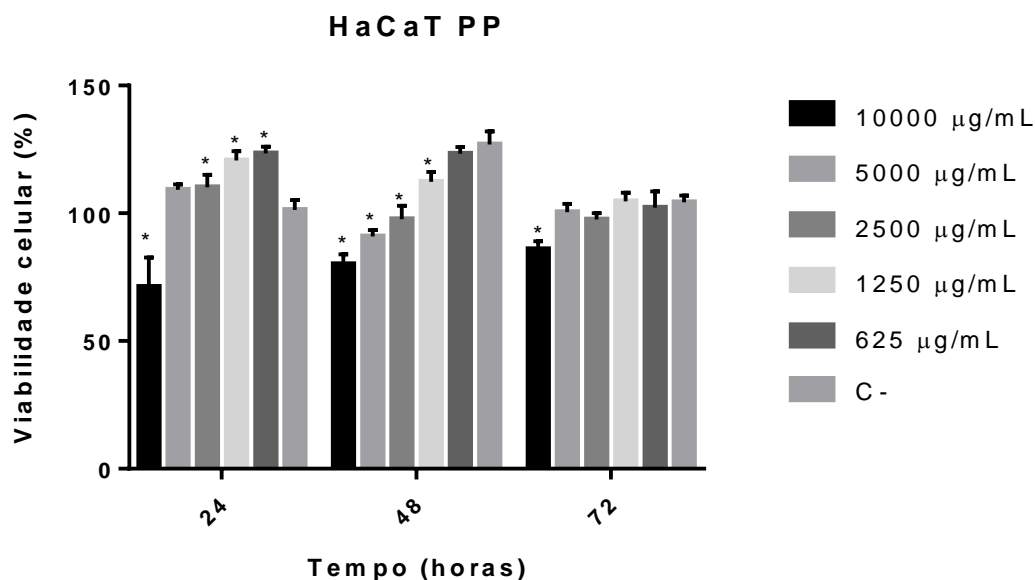


Figura 21: Viabilidade da linhagem HaCat frente ao caldo fermentado puro de *P. polymyxa* em diferentes concentrações, nos tempos de 24, 48 e 72 horas. Os valores são expressos como média + desvio padrão. * Significância estatística de $p \leq 0.05$.

O caldo fermentado puro demonstrou citotoxicidade em HaCat apenas na concentração de $10000 \mu\text{g/mL}^{-1}$, sendo que o mesmo na concentração de $5000 \mu\text{g/mL}^{-1}$ apresentou alta viabilidade celular, mantendo-se em 100% de viabilidade em 24 horas, 90,93% em 48 horas e 100% em 72 horas. Nas concentrações abaixo das citadas, a viabilidade manteve-se a cima de 100% em todos os casos.

Os ensaios de toxicidade *in vitro* são de grande utilidade, uma vez que estes permitem avaliar as alterações celulares produzidas de acordo com diferentes estímulos (KHATIBISEPEHR et al., 2011; Neris, 2018). Tal técnica tem como vantagem a possibilidade da análise de sinais de toxicidade precoce, uma vez que o ensaio envolve a avaliação da atividade mitocondrial (MOSMANN (1983).

Em um estudo recente foram analisados 31 extratos fúngicos em relação a sua bioatividade sobre a linhagem celular HEK (célula embrionária de rim humano). Dos isolados testados, o extrato produzido por *B. petrensis*, não apresentou toxicidade frente a linhagem HEK. O mesmo foi selecionado como de principal interesse pois além de não apresentar citotoxicidade contra tais células, apresentou atividade contra duas linhagens celulares cancerígenas. Sendo então um forte candidato para posteriores estudos como agente anticancerígeno (SAHOO; SUBBAN; CHELLIAH, 2021).

Um outro estudo visou isolar microrganismos endofíticos da espécie vegetal *Terminalia catappa*, dentre diversos isolados, foi selecionado após uma triagem inicial o extrato produzido pela cepa *Trichoderma sp*, a qual foi submetida a avaliação de sua citotoxicidade frente a linhagem celular HFF (fibroblasto de prepúcio humano). O extrato exibiu uma concentração de citotoxicidade de 50% (CC₅₀) de 268,4 µg/mL⁻¹ contra células HFF. Mesmo com uma CC₅₀ relativamente baixa, tal extrato apresentou IC₅₀ de 33,35 µg/ml⁻¹ contra a linhagem celular HeLa (câncer cervical), apresentando então índice de seletividade (MAJOU MOUO et al., 2020). No presente estudo foram usadas maiores concentrações do caldo fermentado para tal análise, porém o mesmo demonstrou baixa citotoxicidade em células saudáveis, indicando que tais concentrações não são um fator preocupante.

4.6 Migração celular

Para o teste de migração celular, após o cultivo das células HDFn em placas de 48 poços foi realizado um risco em cada poço. O risco foi avaliado sendo fotografado de 6 em 6 horas nas primeiras 24 horas e também nos tempos de 48 e 72 horas. Podemos observar nas imagens obtidas durante o teste onde foi utilizado o caldo fermentado de *P. polymyxa* (Figura 22), que o controle teve a migração celular completa fechando todo o risco em 48 horas. Para as concentrações de 1250 e 625 $\mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$ a migração deu-se por completa também em 48 horas, apresentando comportamento similar ao controle. Nas concentrações de 2500 e 5000 $\mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$ a migração se completou em 72 horas. Já na concentração de 10000 $\mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$ não houve presença de migração celular, sendo assim, o caldo fermentado nessa concentração foi considerado como tóxico, corroborando com os dados apresentados nos testes de MTT.

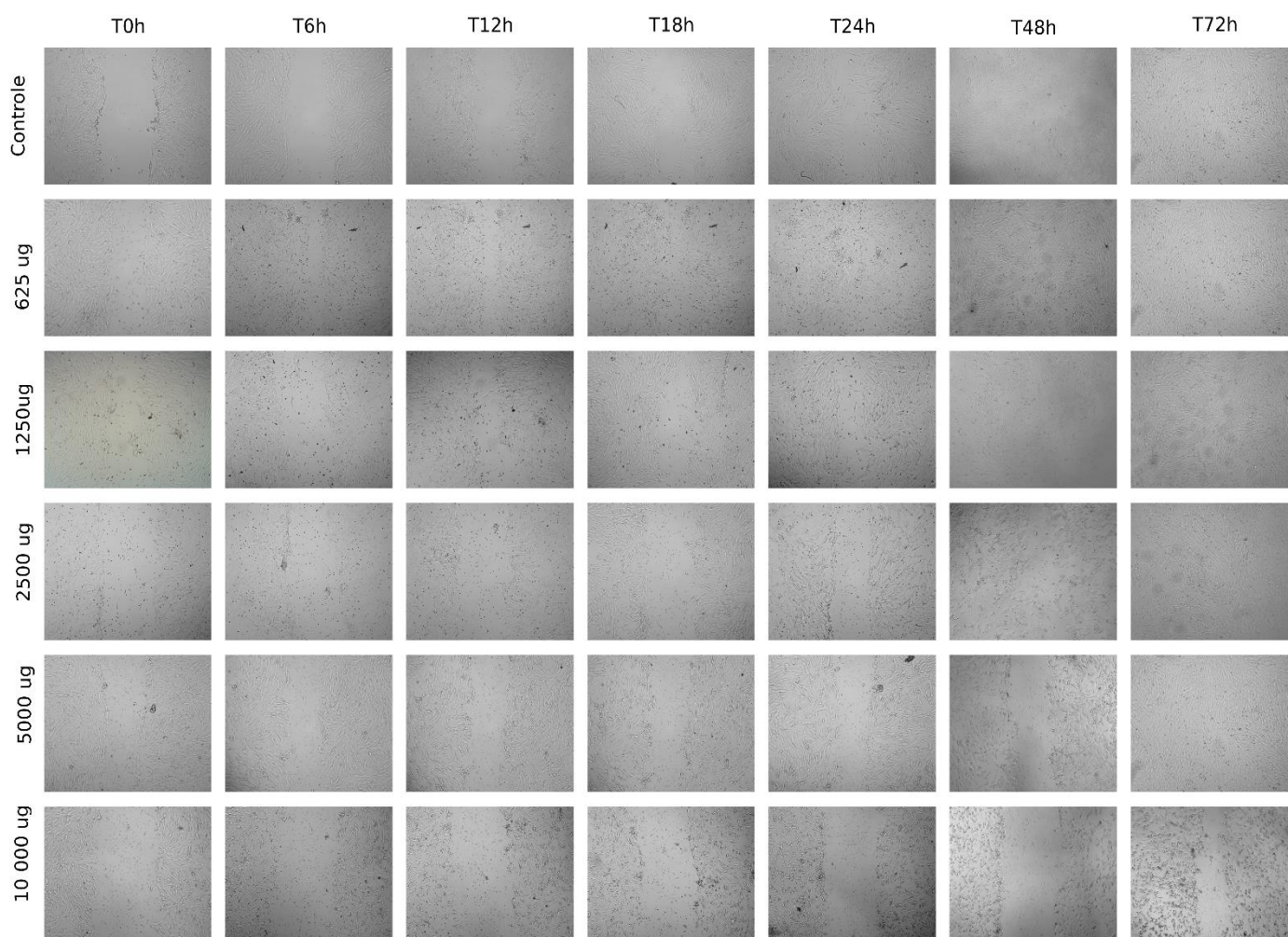


Figura 22: Fotomicrografias representativas em diferentes tempos do cultivo celular para análise de migração celular da linhagem HDFn frente ao caldo fermentado de *P. polymyxa*.

Para o caldo fermentado de *P. polymyxa* mais *S. aureus* (Figura 23), o controle teve a migração celular completa fechando todo o risco em 48 horas. Para as concentrações de 1250 e 625 $\mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$ a migração deu-se por completa também em 48 horas, apresentando comportamento similar ao controle. Nas concentrações de 2500 e 5000 $\mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$ a migração se completou em 72 horas. Já na concentração de 10000 $\mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$ não houve presença de migração celular, sendo assim, o caldo fermentado nessa concentração foi considerado como tóxico, corroborando com os dados apresentados nos testes de MTT. Os dois caldos comportaram-se de maneira similar no teste, demonstrando que o caldo fermentado em cultivo misto não aumenta sua citotoxicidade, quando comparado com o caldo fermentado de cultivo simples.

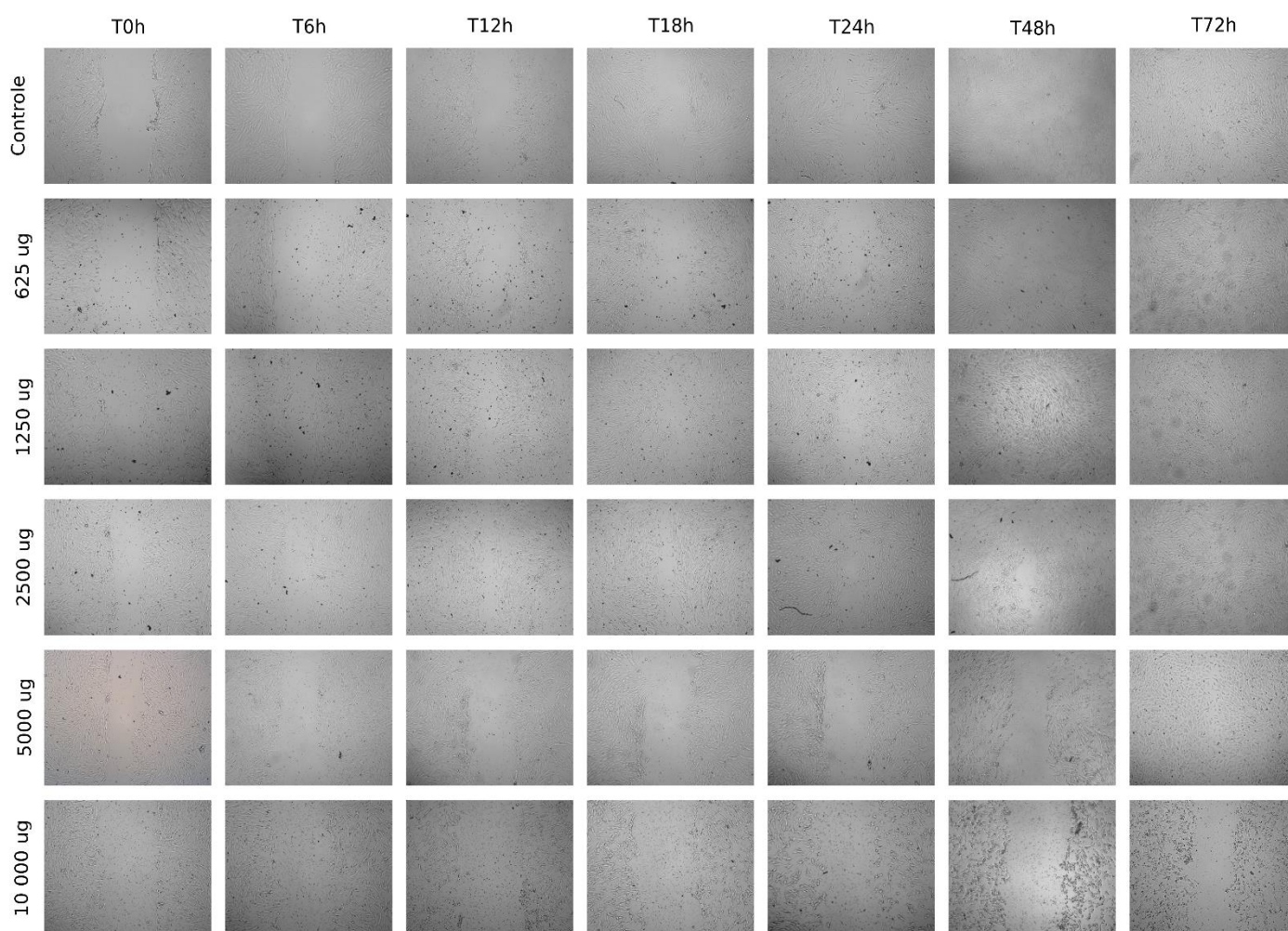


Figura 23: Fotomicrografias representativas em diferentes tempos do cultivo celular para análise de migração celular da linhagem HDFn frente ao caldo fermentado de *P. polymyxa* mais *S. aureus*.

Para a migração celular utilizando a linhagem HaCat, foi realizado o mesmo procedimento, porém as fotos foram capturadas de 8 em 8 horas nas primeiras 24 horas e também nos tempos de 48 e 72 horas. Isso se deve ao fato de que tal linhagem celular apresenta crescimento mais lento quando comparado a anterior. Podemos observar nas imagens obtidas durante o teste onde foi utilizado o caldo fermentado de *P. polymyxa* (Figura 24), que o controle teve a migração celular completa fechando todo o risco em 48 horas. Para as concentrações de 2500, 1250 e 625 $\mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$ a migração deu-se quase por completo em 48 horas, porém ainda haviam algumas pequenas regiões apresentando um espaçamento, as quais foram completadas em 72 horas. Nas concentrações de 5000 e 10000 $\mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$, não foi estabelecida a migração por completo.

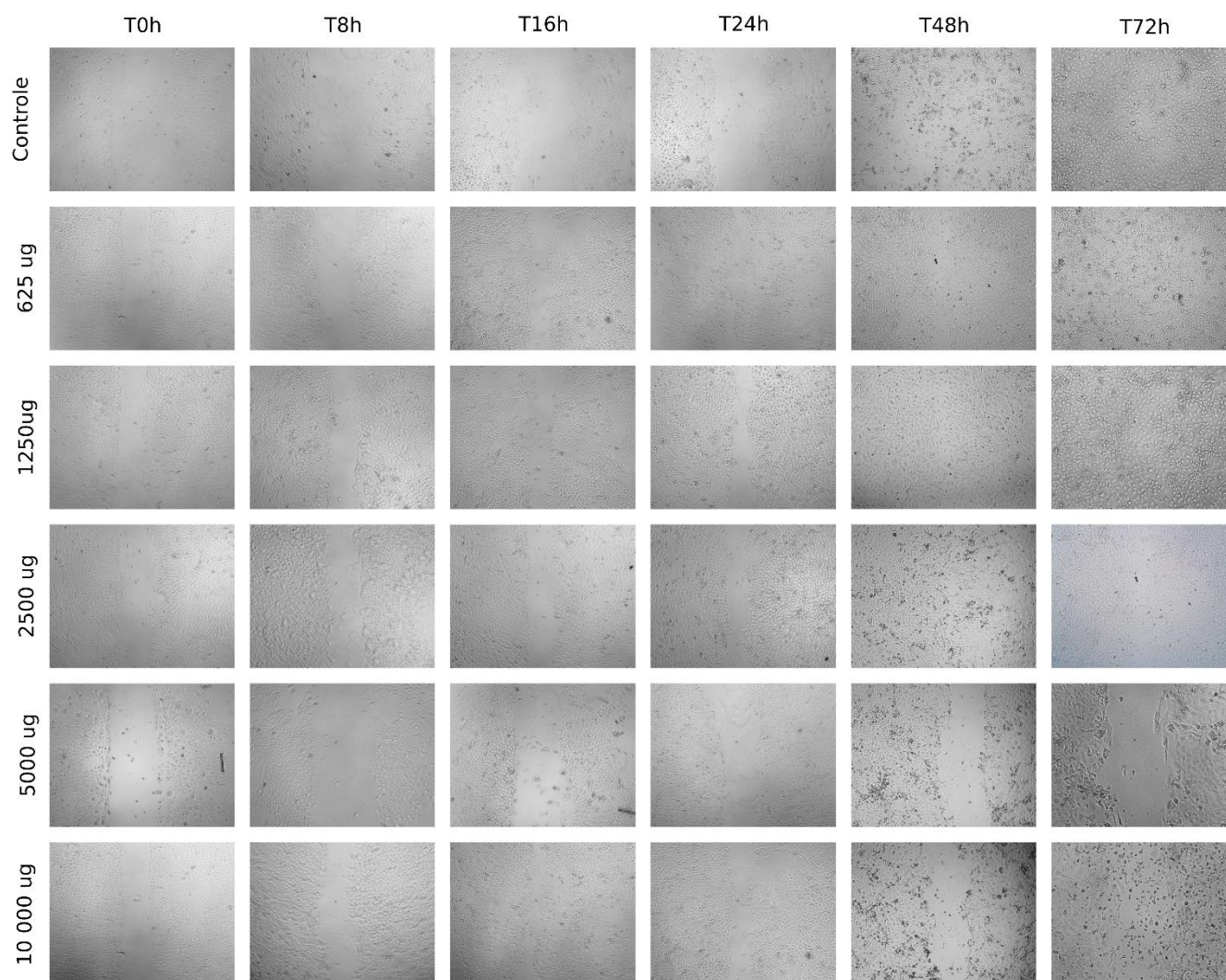


Figura 24: Fotomicrografias representativas em diferentes tempos do cultivo celular para análise de migração celular da linhagem HaCat frente ao caldo fermentado de *P. polymyxa*.

Para o caldo fermentado de *P. polymyxa* mais *S. aureus* (Figura 25), o controle teve a migração celular completa fechando todo o risco em 48 horas, como observado também na concentração de 625 $\mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$. Para as concentrações de 2500 e 1250 $\mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$ a migração deu-se por completa em 72 horas, porém a concentração de 2500 $\mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$ ainda apresenta um espaçamento com ausência de crescimento, isso pode ser devido a localização da ranhura realizada no início do experimento. Nas concentrações de 5000 e 10000 $\mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$, não foi estabelecida a migração por completo.

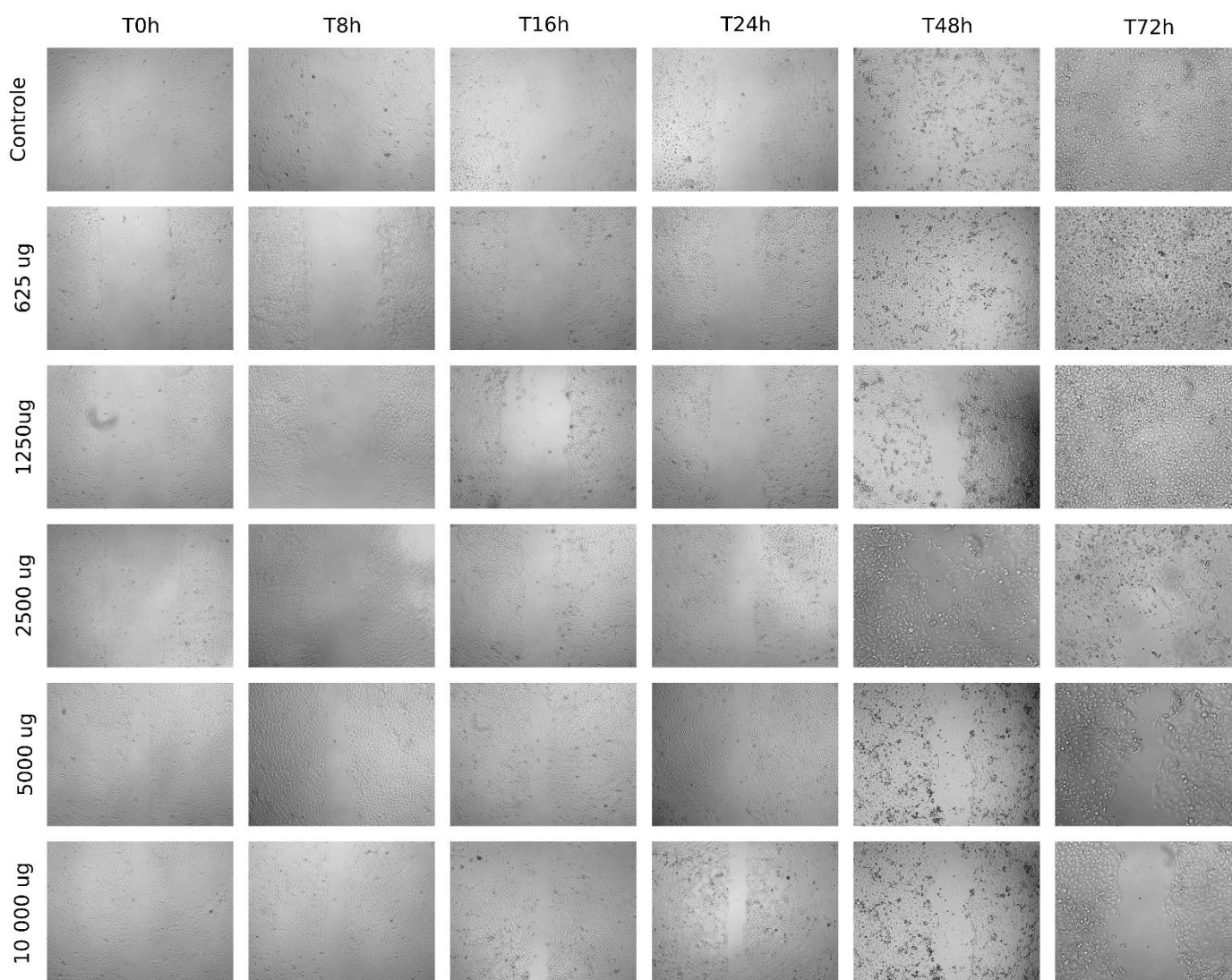


Figura 25: Fotomicrografias representativas em diferentes tempos do cultivo celular para análise de migração celular da linhagem HaCat frente ao caldo fermentado de *P. polymyxa* mais *S. aureus*.

A motilidade é uma característica essencial das células vivas e a migração celular é importante para manter a organização ideal dos organismos

multicelulares. Em um organismo adulto, a migração celular é necessária para uma resposta imune adequada, reparo de tecidos e homeostase dos tecidos além de ser importante também em processos patológicos, como metástases e inflamação do câncer. Os fibroblastos cultivados *in vitro*, possuem uma morfologia espalhada ou fusiforme caracterizada por vários processos de extensão. Na cultura de células, eles se movem lentamente, com uma velocidade média inferior a 1 $\mu\text{m}/\text{min}$ e frequentemente mudam de direção (TREPAT; CHEN; JACOBSON, 2012).

Uma outra célula, também estudada na locomoção celular são os queratinócitos. Um trabalho considerável tem sido dedicado aos mecanismos do citoesqueleto envolvidos na migração dos queratinócitos. Polimerização de actina, esteira, fluxo retrógrado de rede de actina e contratilidade baseada em miosina II, todos desempenham papéis importantes na migração de queratinócitos (FOURNIER et al., 2010; SMALL; HERZOG; ANDERSON, 1995; TREPAT; CHEN; JACOBSON, 2012).

Os métodos para estudar o comportamento migratório celular são ferramentas muito úteis e importantes para o conhecimento em uma ampla área de pesquisa. Os ensaios de migração são amplamente utilizados na comunidade científica. Esses testes podem fornecer os dados necessários que podem permitir a compreensão de quão bem um determinado tipo de célula pode migrar espontaneamente ou responder a um atrativo químico e migrar em direção a ele (JUSTUS et al., 2014).

Em nosso estudo, testamos o efeito dos caldos fermentados obtidos por *P. polymyxa* e por *P. polymyxa* mais *S. aureus* sobre a migração celular de fibroblastos e queratinócitos. Foi observado que dentre os dois caldos, ao fim das 72 horas, o risco não se fechou apenas na concentração mais alta testada de 10.000 $\mu\text{g}/\text{ml}^{-1}$ para HDFn e para HaCat a concentração de 5000 $\mu\text{g}/\text{ml}^{-1}$ também não apresentou uma migração completa em até 72 horas. Estes dados corroboram aos dados dos testes de MTT e demonstram a baixa toxicidade dos extratos sobre estas células, pois após a exposição elas continuaram a crescer normalmente. Foram feitas buscas pela literatura e não foram encontrados estudos utilizando extratos naturais ou qualquer composto químico sobre estas células utilizando o teste de migração celular. Estes ensaios são amplamente

feitos com células tumorais ou para a apresentação de novas técnicas experimentais.

4.7 Citotoxicidade em HepG2/C3a hepatoma de fígado humano

A análise da citotoxicidade dos caldos fermentados de *P. polymyxa* (Figura 26), e *P. polymyxa* mais *S. aureus* (Figura 27), indicou efeito citotóxico em praticamente todas as concentrações testadas. Para ambos os caldos fermentados puro e misto, a porcentagem de mortalidade celular nas concentrações de 10000 e 5000 $\mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$ manteve-se entre 80 e 90% nos três tempos analisados. Já nas concentrações de 2500 e 1250 $\mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$, o índice de mortalidade celular se estabeleceu entre 60 a 80% levando em consideração os três tempos analisados. Para a concentração de 625 $\mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$ não foi constatado valor de morte celular significativo. Os caldos fermentados também não apresentaram diferença significativa entre eles. Podemos afirmar ainda que os caldos fermentados apresentaram uma boa atividade contra a linhagem celular C3a nas concentrações de 10000, 5000 e 2500 $\mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$. Vale também ressaltar que as concentrações de 5000 e 2500 $\mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$ não apresentaram toxicidade contra as linhagens de células de fibroblastos dérmicos humanos neonatais (HDFn) e queratinócitos humano (HaCaT).

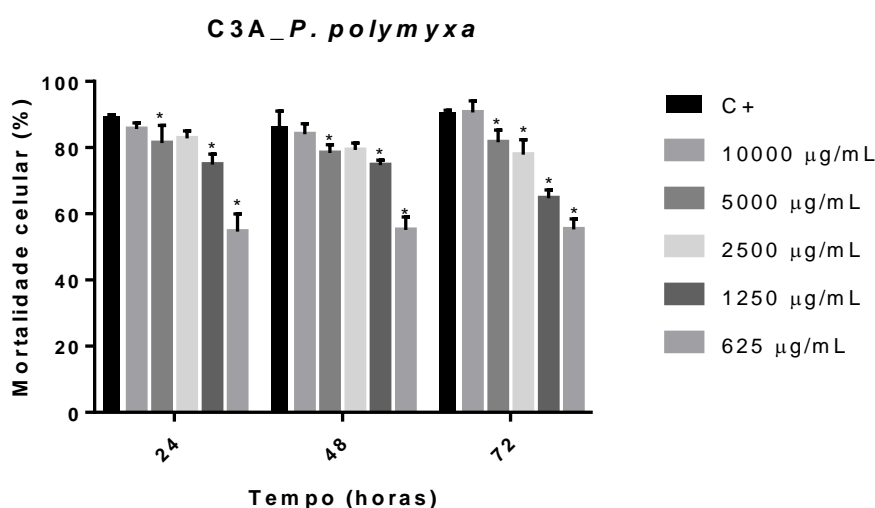


Figura 26: Ação do caldo fermentado por *P. polymyxa* frente a linhagem celular C3a (hepatoma de fígado humano). Os valores representam a taxa de mortalidade celular nas diferentes concentrações do caldo nos tempos de 24, 48 e 72 horas. Os valores são expressos como média + desvio padrão. *Significância estatística de $p \leq 0.05$.

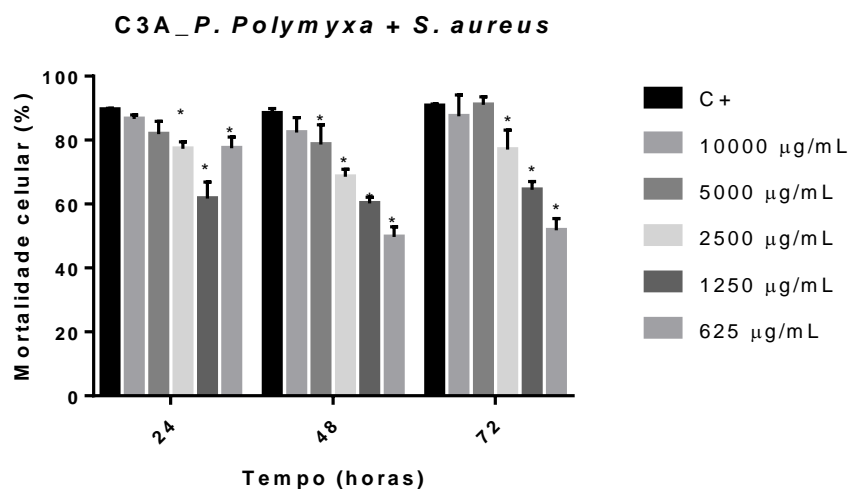


Figura 27: Ação do caldo fermentado por *P. polymyxa* mais *S. aureus* frente a linhagem celular C3a (hepatoma de fígado humano). Os valores representam a taxa de mortalidade celular nas diferentes concentrações do caldo nos tempos de 24, 48 e 72 horas. Os valores são expressos como média + desvio padrão. * Significância estatística de $p \leq 0.05$.

Um outro estudo, onde foi avaliado a citotoxicidade do caldo fermentado produzido por *P. polymyxa*, frente a mesma linhagem celular aqui discutida, nas concentrações de 4000; 400; 40; 4; 0,4; e 0,04 $\mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$ indicou efeito citotóxico apenas para a concentração de 4000 $\mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$. Baseado nesse estudo selecionou-se, então, para o presente trabalho somente concentrações a cima de 400 $\mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$ (BIANCHI et al., 2021). Alguns outros estudos vêm mostrando que algumas cepas de *P. polymyxa* produzem metabólitos secundários com atividades antioxidantes e antitumorais que são conferidas principalmente por carboidratos, sendo estes exopolissacarídeos e peptídeos, incluindo lipopeptídeos não ribossômicos, como polimixinas e fusaricidinas (GRADY et al., 2016).

Há relatos que o peptídeo antimicrobiano surfactina, composto semelhante ao produzido por *Bacillus subtilis*, tem um efeito antiproliferativo na linhagem celular LoVo (adenocarcinoma de cólon). Estes peptídeos além de serem antimicrobianos, demonstram efeito antitumoral (KIM et al., 2007). Portanto, o caldo fermentado utilizado, além de exibir atividade antimicrobiana, pode ser usado como um possível antitumoral.

Em um outro estudo foram analisados 31 extratos fúngicos em relação a sua bioatividade sobre linhagens de celulares: HeLa (adenocarcinoma cervical humano), A431 (células de câncer de pele), HepG2 (hepatoma de fígado humano) e MCF-7 (células cancerosas de mama). Todos os extratos fúngicos apresentaram citotoxicidade contra ambas células cancerosas, porém uma citotoxicidade significativa foi observada nos extratos oriundos de 9 fungos: *Periconia byssoides*, *Coniochaeta sp.*, *C. cladosporioides*, *Biscogniauxia petrensis*, *Nigrospora oryzae*, *Gymnascella aurantiaca*, *Gliomastix murorum*, *Nectria dematicosa* e *Ascotricha sinuosa*. Entre os fungos, o extrato produzido por *B. petrensis* exibiu efeitos citotóxicos e apoptóticos significativos demonstrando valores de CC50 para as células HeLa e A431 de 24,85 e 18,04 $\mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$, respectivamente (SAHOO; SUBBAN; CHELLIAH, 2021). Assim como no trabalho citado, as concentrações utilizadas no presente estudo não foram tóxicas às linhagens celulares normais testadas. Sendo assim, os próximos passos é ter os compostos citotóxicos purificados e caracterizados para a análise de seu mecanismo de ação em células cancerosas e modelos de camundongos.

5. CONCLUSÃO

Podemos concluir com este estudo que os caldos fermentados, quando cultivados utilizando da técnica do cultivo misto, não necessitam de um meio de cultivo diferente daquele já estabelecido como o ideal quando em cultivo simples. A única alteração necessária para a produção do caldo fermentado quando em cultivo misto foi o acréscimo de tempo de fermentação, que passou de 96 horas para 168 horas, onde teve seu maior pico de bioatividade. Em relação a sua atividade antimicrobiana, os caldos quando em cultivo misto aumentaram significativamente seu potencial, assim como sugerido em literatura.

No geral o caldo fermentado mais promissor deste estudo foi o caldo estabelecido por cultivo misto de *P. polymyxa* mais *S. aureus*, aumentando sua bioatividade perante a cepas bacterianas potencialmente patogênicas e também nas menores concentrações testadas em promastigotas de *L. infantum chagasi*. Em relação a atividade anti-tumoral não houve diferença entre os caldos fermentados simples e misto, ambos apresentaram atividade antitumoral em concentrações similares.

Outro importante dado obtido no presente estudo foi em relação a citotoxicidade dos caldos fermentados, mostrando que ambos os cultivos, simples e misto, apresentaram baixa citotoxicidade mesmo em altas concentrações. Os caldos fermentados analisados demonstraram citotoxicidade apenas quando na concentração de $10000 \mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$, isso se tratando das duas linhagens utilizadas para esse estudo.

Quando relacionamos os valores obtidos nos testes de citotoxicidade com os dados obtidos nos ensaios de bioatividade podemos afirmar que as concentrações necessárias para: A- atividade antimicrobiana; B- atividade leishmanicida; C- atividade contra linhagem tumoral C3a não são tóxicas para células humanas.

CAPÍTULO 2:

Bioprospecção de peptídeos antimicrobianos oriundos de microrganismos endofíticos isolados das espécies vegetais: Coffea arabica e Xylopia aromatica

1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1 Microrganismos endofíticos

A busca por produtos bioativos a partir de plantas no Brasil é de grande importância, sendo um grande ponto de acesso devido à sua extensa biodiversidade. No entanto, plantas brasileiras nativas úteis não são utilizadas de maneira ideal. Isso acarreta consequências como a intensa destruição da vegetação nativa, bem como a miscigenação de culturas (BRANDAO; GRAEL; FAGG, 2011). Há vários relatos em literatura comprovando que endofíticos possuem a capacidade de produzir compostos naturais bioativos para inibir o crescimento de outros organismos e assim gerar uma vantagem seletiva para a planta hospedeira (GUBIANI, 2015; SERRANO, 2014; STROBEL et al., 2004). Esses microrganismos associados às plantas também desenvolvem a habilidade bioquímica de produzir metabólitos similares ou idênticos àqueles produzidos por suas plantas hospedeiras como um resultado de recombinação genética durante seu processo evolucionário (GUNATILAKA, 2012).

Os microrganismos endofíticos foram mencionados pela primeira vez no início do século XIX; e apenas no final da década de 70 foi verificado que estes organismos possuem propriedades metabólicas de interesse em diversas áreas (STROBEL; DAISY, 2003). Estas bactérias, que colonizam o tecido interno (os espaços intercelulares) das plantas, sem indicar qualquer influência negativa em seu hospedeiro, constituem um grande reservatório de diversidade bacteriana com um impressionante potencial biotecnológico (RYAN et al., 2008).

Originalmente o termo endófito (endo: dentro + fito: planta) foi descrito por De Bary (1866), que propôs uma possível distinção entre os endofíticos e os patógenos de plantas. Essa comunidade endofítica é constituída principalmente por fungos e bactérias, ao contrário dos microrganismos patogênicos, não causa prejuízos à planta hospedeira (NETO; AZEVEDO; ARAÚJO, 2003). Bactérias benéficas associadas às plantas desempenham um papel importante na saúde e no crescimento destas sob vários estresses ambientais, beneficiando o crescimento por vários mecanismos e ainda diminuindo efetivamente os efeitos adversos do estresse ambiental (ETESAMI; MAHESHWARI, 2018). Microrganismos endofíticos são definidos como fungos ou bactérias que colonizam o interior dos tecidos de plantas, sem apresentar efeito patogênico ao

hospedeiro (ARAÚJO et al., 2008). Embora não provoquem sinais ou sintomas evidentes de sua aparência na planta, os endófitos podem existir como simbioses, fornecendo ao hospedeiro alguma forma de proteção contra várias injúrias ambientais, como o ataque de pragas, patógenos ou ainda potenciais estresses ambientais (STROBEL et al., 2017). Microrganismos endofíticos podem ser encontrados na maioria das espécies vegetais e então isoladas de raízes, folhas, caules, flores, frutos e sementes. Os endófitos bacterianos vivem em regiões intercelulares das paredes celulares e dos vasos de xilema e podem colonizar sementes, frutos e flores, entre outros tecidos. Sugere-se que as bactérias endofíticas estão localizadas no apoplasto, e as raízes das plantas são propostas como o ponto de entrada (EK-RAMOS et al., 2019).

A microbiota endofítica vem sendo frequentemente estudada em diversas espécies de plantas, sendo que os principais representantes encontrados estão amplamente distribuídos entre bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, podendo citar alguns gêneros como: *Acinetobacter*, *Actinomyces*, *Bacillus*, *Enterobacter*, *Flavobacterium*, *Paenibacillus*, *Pantoea*, *Pseudomonas*, *Streptomyces*, dentre outras (ANDRADE, 2019; LODEWYCKX et al., 2002; QUADT-HALLMANN; KLOEPPER; BENHAMOU, 1997; WHITE et al., 2018)

Estudos vem demonstrando o importante papel desses microrganismos endofíticos na produção de diversas moléculas de interesse biotecnológico, incluindo moléculas de interesse clínico com atividades antimicrobianas (ASSIS, 2018; SERRANO, 2014), e leishmanicidas (ASSIS, 2018; NERIS et al., 2018).

Uma ampla gama de antibióticos produzidos por actinobactérias isoladas de plantas medicinais demonstra o grande potencial de bioatividade contra bactérias, fungos e vírus. Os metabólitos com potencial antimicrobiano exibiram atividade em concentrações significativamente baixas. Esses achados sublinham um potencial antimicrobiano promissor e de amplo espectro dos metabólitos secundários obtidos a partir de endofíticos (GOLINSKA et al., 2015). Além disso, inúmeras espécies de microrganismos endofíticos forneceram vários compostos anticâncer, antimicrobiano, antidiabético, inseticida e imunossupressor (SCHNEIDER; MISIEK; HOFFMEISTER, 2008). Os endofíticos considerados mais abundantes na produção de metabólitos são os Gram-

positivos com destaque para os gêneros *Bacillus* e *Streptomyces* (FRANK; SALDIERNA GUZMÁN; SHAY, 2017).

Endofíticos em geral, assim como as actinobactérias são já definidos como produtores de um amplo espectro de moléculas bioativas. Estes empregam vias de peptídeo sintetase não ribossômica (NRPS) e policetídeo sintase (PKS) para alcançar a diversidade estrutural e funcional de seus metabólitos, que se enquadram em importantes classes farmacêuticas, como alcaloides, flavonoides, esteroides, terpenoides, fenólicos, quinonas e peptídeos. Tais metabólitos já foram relatados na literatura como produtores de imunossupressores (por exemplo, Rapamicina), antibióticos (Eritromicina), drogas anticolesterol (Lovastatina) e drogas anticâncer (Epotilona B) (SINGH; DUBEY, 2018). Uma cepa bacteriana pode sintetizar várias isoformas polipeptídicas, estando os lipopeptídeos entre as classes mais importantes de metabólitos secundários produzidos por bactérias endofíticas, estes são formados por peptídeos lineares, cíclicos ou curtos ligados a uma cauda lipídica ou moléculas lipofílicas (RAAIJMAKERS et al., 2010).

Atualmente, muitos pesquisadores defendem a opinião que a exploração de áreas biologicamente diversas podem levar à identificação de novos produtos naturais (ASSIS, 2018; PYE et al., 2017; TRIPATHI et al., 2018). Segundo o ministério do meio ambiente (MMA) e o Instituto Brasileiro de Geografia e Bioestatística (IBGE), o Cerrado é um mosaico de biomas, sendo o segundo maior encontrado na América do Sul, ocupando atualmente uma área de 2.036.448 km², aproximadamente 22% do território nacional. O cerrado brasileiro é hoje, considerado como a savana mais rica do mundo, abrigando 11.627 espécies de plantas nativas já catalogadas, elevando-o assim como uma área biologicamente diversa com grande potencial biotecnológico derivado tanto das espécies vegetais presentes assim como dos microrganismos integrados a elas (MMA, 2004). Estes fatos demonstram a grande importância que o bioma cerrado tem na pesquisa de novas moléculas de extratos vegetais, assim como extratos obtidos a partir de microrganismos isolados destes vegetais.

1.2 Microrganismos rizosféricos

Por definição, a rizosfera é considerada como a zona de contato entre o solo e as raízes das plantas, sendo um importante nicho microbiológico, onde podem ser encontrados fungos, bactérias, nematoides, protozoários, algas, vírus, artrópodes e *archaea*. Esta zona representa uma região rica em nutrientes, isso devido a liberação de diversos compostos das raízes para o solo (BATISTA, 2012; MOREIRA; SIQUEIRA, 2006). Estima-se que a cada grama de solo é possível de se encontrar cerca de 10 bilhões de microrganismos ali presentes. Este número de espécies microbianas cresce a cada ano, sendo descrito mais de 47.000 espécies de fungos, 30.000 protozoários, 26.000 algas, 5.000 bactérias e 1.000 vírus. Destes microrganismos, os principais são os fungos e bactérias, pois são responsáveis pelos processos de decomposição de compostos orgânicos (BARBOSA et al., 2021; SOUZA, 2016).

Esses microrganismos também podem oferecer substâncias de interesse da planta, essa relação benéfica propicia uma alta densidade de microrganismos ao redor das raízes. A deposição de vários exsudatos pela raiz da planta também modifica as propriedades químicas e físicas do solo, favorecendo a abundância rizosférica, formando um habitat microbiano do solo mais ativo (ANDRADE, 2019; MOREIRA; SIQUEIRA, 2006).

Os actinomicetos são bactérias Gram-positivas, as quais são caracterizadas por apresentarem em sua estrutura uma membrana fosfolipídica e camadas espessas de peptidoglicano, comumente contém em seu genoma altas concentrações de citosina e guanina. Essas bactérias foram caracterizadas por alguns pesquisadores como fungos por um longo período, isso devido ao seu crescimento filamentosos, além da produção de micélio e esporos, o que concede a esta classe alto nível de resistência em diversos habitats, como água, animais, pedras, plantação e, principalmente, o solo (AMARAL et al., 2020).

Já se constatou que 30% de toda microbiota do solo é constituída por actinomicetos, dentre as espécies mais comumente isoladas, encontra-se o gênero *streptomyces*. Essas bactérias se destacam pela produção variada de metabólitos secundários, apresentando ação que auxiliam no combate de patógenos, bactérias e fungos (AMARAL et al., 2020; KENNEDY, 1999)

1.3 Microrganismos isolados do Cerrado

O Brasil possui uma das maiores diversidades genéticas do mundo, concretizada por seis principais biomas: Floresta Amazônica, Cerrado, Mata Atlântica, Pantanal, Campos do Sul e Caatinga. O Cerrado localiza-se principalmente no Planalto Central Brasileiro e é um ecossistema similar às Savanas da África e da Austrália. É constituído por árvores relativamente baixas (até vinte metros), distribuídas entre arbustos e gramíneas. A vegetação típica do cerrado possui troncos e ramos retorcidos, cascas espessas e folhas grossas. O cerrado brasileiro é reconhecido como a savana mais rica do mundo em biodiversidade: a flora tem 4.400 espécies exclusivas; a fauna apresenta 837 espécies de aves, 67 gêneros de mamíferos, 150 espécies de anfíbios e 120 de répteis (MMA, 2004).

Algumas espécies vegetais do Cerrado ganharam certo destaque devido sua capacidade de produzirem compostos bioativos. A avaliação do potencial terapêutico de espécies vegetais e alguns de seus constituintes, como flavonoides, alcaloides, triterpenos, entre outros, tem sido objeto de uma ampla gama de estudos em que certas ações farmacológicas já foram consolidadas com base em estudos pré-clínicos (PIZA; HOKKA; SOUSA, 2015).

Também existem numerosos estudos sugerindo que microrganismos endofíticos são ricas fontes na produção de metabólitos secundários incluindo os flavonoides (TANG et al., 2020). Com a expansão do valor medicinal e da perspectiva do mercado, um número crescente de pesquisadores está tentando encontrar uma nova maneira de produzir mais flavonoides. No entanto, como a produção metabólica de plantas é limitada pelo ambiente e pela especificidade espaço-temporal, é difícil melhorar o rendimento de flavonoides oriundos de espécies vegetais, diferentemente dos microrganismos, que se tornam uma fonte de exploração viável para determinado fim (ARISAWA; WATANABE, 2017).

1.4 *Xylopiá Aromática*

Xylopiá aromática, popularmente conhecida como “pimenta-de-macaco”, é uma árvore de porte pequeno (4-5 m de altura), comumente encontrada nas

florestas costeiras e savanas do Brasil (Cerrado) (STASHENKO; JARAMILLO; MARTÍNEZ, 2004). O gênero *Xylopi*a é um dos mais importantes da família *Annonaceae*, compreendendo aproximadamente 160 espécies amplamente distribuídas em regiões tropicais e subtropicais das Américas, África, Ásia e Oceania. No Brasil estão distribuídas nas áreas tropicais e de savana incluindo-se, entre essas áreas, o Cerrado da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar) (OLIVEIRA et al., 2018).

Do ponto de vista químico, esse gênero tem sido extensivamente estudado por causa de suas numerosas espécies odoríferas (FOURNIER; LEBOEUF; CAVÉ, 1999). Estudos sobre a avaliação da composição química de óleos essenciais em espécies de *Xylopi*a (*X. frutescens*, *X. sericea*, *X. brasiliensis*, *X. nitida* e *X. langsdorffiana*) foram relatados destacando que os frutos de *X. aethiopica* têm efeitos positivos no metabolismo da glicose e lipídios (NWOZO; OROJOBI; ADARAMOYE, 2011).

Em 1988 (MORAES; ROQUE, 1988) relatam a presença de diterpenos, considerados como metabólitos secundários da planta, em frutos coletados de *Xylopi*a *aromática*. No nordeste brasileiro, a *Xylopi*a *laevigata* é uma planta (folhas e flores) usada popularmente para tratar distúrbios dolorosos, doenças cardíacas e condições inflamatórias. Também foi demonstrado atividade anticâncer do óleo essencial de *X. laevigata* (QUINTANS et al., 2013). No entanto, há pouca informação sobre as propriedades biológicas do gênero *Xylopi*a *sp em geral*. Um outro estudo do mesmo grupo revela propriedades farmacológicas ligadas a atividades antioxidante, analgésica e anti-inflamatória da *Xylopi*a *laevigata* (QUEIROZ et al., 2014). Ainda há estudos apontando que o extrato obtido a partir de folhas de *Xylopi*a *amazonica* demonstrou atividade antiplasmodial *in vitro* e foram analisados quanto à atividade antimalárica *in vivo*, demonstrando uma supressão de 52% no quinto dia de infecção (LIMA et al., 2015).

No que diz respeito à sua ação biológica, a atividade inseticida e propriedades antissépticas e analgésicas já foram descritas, sendo encontradas em diferentes extratos obtidos a partir de várias espécies de *Xylopi*a *spp.* (STASHENKO; JARAMILLO; MARTÍNEZ, 2004). Atividades antimicrobianas do extrato vegetal obtido a partir da casca, do caule, das folhas e das flores de *X.*

aromatica contra microrganismos Gram-positivos e Gram-negativos também foram determinadas em estudos anteriores (FOURNIER et al., 1994; NASCIMENTO et al., 2018b).

1.5 Microrganismos endofíticos isolados de *Coffea arabica*

O café (*Coffea* sp.) pertence à família *Rubiaceae*, a qual apresenta cerca de 500 gêneros e mais de 6.000 espécies. Trata-se do gênero mais importante, em termos econômicos (MARTINS, 2012). O Brasil desenvolve o maior programa mundial de pesquisas em café, seus avanços significativos estão relacionados a consideráveis investimentos em pesquisas em diversas áreas de grande importância como: biotecnologia, melhoramento genético, manejo de pragas, controle biológico, potencial enzimático, dentre outras (MAPA, 2019; RICCI et al, 2002).

Os principais ácidos graxos oriundos do óleo de café verde são os ácidos palmítico e linoleico. A grande porcentagem da fração insaponificável contém esteróis, diterpenos livres, ceras e vários outros componentes menores cujas propriedades biológicas, incluindo atividade antioxidante, antimicrobiana e antiproliferativa, foram previamente relatadas (RABA et al., 2015).

Um estudo realizado (ANDRADE, 2019) mostra que de 100 isolados testados contra os fungos fitopatogênicos, mais de 40% apresentaram alguma atividade antagônica contra certos fitopatógenos e mais de 30% tiveram alguma atividade enzimática comprovada. Também foi comprovada a atividade de promoção de crescimento vegetal de algumas cepas em relação a plântulas de café.

Muitos compostos promotores de crescimento em plantas mostraram citotoxicidade contra células tumorais (EK-RAMOS et al., 2019). Então é muito provável porém não demonstrado até o momento, que esses microrganismos também apresentem alguma atividade contra microrganismos potencialmente patogênicos.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivos específicos

- Isolar microrganismos endofíticos e rizosféricos a partir da espécie vegetal *Xylopiá aromática*;
- Selecionar cepas endofíticas das espécies vegetais *Coffea arabica* e *Xylopiá aromática*, que apresentem atividade direta contra cepas potencialmente patogênicas indicadoras: *S. aureus*, *E.coli* e *C. albicans*;
- Padronizar melhores condições de cultivo das culturas puras dos endofíticos selecionados a partir da determinação da curva de crescimento em diferentes meios de cultura;
- Avaliar a atividade antimicrobiana apresentada pelos caldos fermentados nos tempos pré-estabelecidos durante a curva.
- Avaliar a atividade antimicrobiana apresentada pelos caldos fermentados de cepas isoladas a partir da espécie vegetal *Coffea arabica* e *Xylopiá aromática*.

3. METODOLOGIA

3.1 Isolamento Bacteriano

Foram coletados folhas, ramos, frutos e solo rizosférico da espécie vegetal *Xylopia aromatica* localizados na área de Cerrado no campus da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar) - São Carlos - SP, Brasil. A coleta foi realizada no mês de março, durante o período da manhã. Selecionou-se 3 indivíduos desta espécie vegetal para coleta de amostras. Os demais microrganismos utilizados para este estudo foram previamente isolados da espécie vegetal *Coffea arabica* (ANDRADE, 2019).

As amostras foram acondicionadas em sacos plásticos e transportadas para o Laboratório de Microbiologia e Biomoléculas (LaMiB) do Departamento de Morfologia e Patologia (DMP) da UFSCar. Foram selecionados os tecidos vegetais propícios para o isolamento, ou seja, tecidos saudáveis, sem manchas ou lesões causadas por patógenos. Estes tecidos foram processados em um intervalo máximo de duas horas (TORRES, 2018).

Foram coletados 5 ramos de cada exemplar selecionado para coleta, todos os quais contendo folhas e frutos saudáveis. Foram pesados aproximadamente 15 g de cada tecido vegetal, os quais foram submetidos ao procedimento de desinfecção superficial com o objetivo de eliminar os microrganismos epifíticos. Nesse processo as folhas foram sequencialmente imersas em etanol 70% por 1 minuto, solução de hipoclorito de sódio 3% por 1 minuto, etanol 70% por 30 segundos. Já os ramos e os frutos foram imersos em etanol 70% por 1 minuto, solução de hipoclorito de sódio 3% por 3 minutos e etanol 70% 1 minuto. Por fim, para ambas as amostras, foram realizados dois enxágues em água destilada esterilizada, sendo que 100 µL da segunda água de enxágue foram plaqueadas em Ágar Triptona de Soja (TSA) comercial (SIGMA), para garantir a eficiência do processo de desinfecção (ARAUJO, et al., 2014; ANDRADE, 2019).

Após desinfecção superficial as folhas e os ramos foram cortados, assepticamente, em pedaços de 0,1-0,5 cm, os quais foram colocados em 15 mL de tampão Fosfato de Sódio (PBS) e mantidos em agitador orbital a 150 rpm por 2 horas à 28 °C. Seguindo desse procedimento, inoculou-se 100 µL da solução de PBS contendo folhas e ramos no meio International *Streptomyces Project-2* (ISP2) o qual é composto por: 10 g/L⁻¹ de extrato de malte; 4 g/L⁻¹ de extrato de

levedura; 4 g/L⁻¹ de glicose; 15 g/L⁻¹ de ágar a pH 7,0, e TSA, as placas foram incubadas a 28 °C por 15 dias.

Se tratando do isolamento de microrganismos rizosféricos, foram coletados de cada um dos três exemplares de *Xylopiá aromática* aproximadamente 50 g de solo rizosférico. Após encaminhados ao LaMiB, foram pesados 10 g das amostras e então estas foram adicionadas em 90 mL de tampão PBS, sendo mantidos em agitador orbital a 150 rpm por 2 horas. Então, a solução contendo PBS mais rizosfera foi submetida a diluições decimais seriadas (10⁻¹ - 10⁻⁴), que foram plaqueadas em meio TSA e ágar ISP2, sendo incubadas nas mesmas condições descritas acima.

Após os 15 dias de incubação, as colônias obtidas foram isoladas pela técnica de esgotamento, obtendo-se então as colônias puras dos microrganismos endofíticos e rizosféricos. Para estocagem dessas colônias, as mesmas foram crescidas em Caldo Triptona de Soja (TSB) comercial (SIGMA) por 48 horas. Em *eppendorfs* previamente esterilizados foram então adicionados 200 µL de TSB com o microrganismo crescido mais 200 µL de glicerol previamente esterilizado. O estoque foi mantido em *freezer* -20 °C por 24 horas e posteriormente transferido para o *ultrafreezer* -80 °C, onde foram mantidos os estoques.

3.2 Triagem da atividade antimicrobiana – Teste do bloco de gelose

O teste do bloco de gelose foi utilizado como bioensaio qualitativo para detectar produção de compostos bioativos. Os microrganismos endofíticos foram crescidos em caldo ISP2 por 48 horas, em seguida foram semeados em forma de tapete, com auxílio de *swab* esterilizado, em placas com ágar ISP2 que foram incubados a 28 °C por 168 horas (ICHIKAWA et al., 1971).

Foram utilizados, como microrganismos indicadores, cepas de *Candida albicans* ATCC 10231, *Escherichia coli* ATCC 25922 e *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. Estas cepas foram reativadas em tubo contendo 5 ml de caldo Trypticase Soy Broth (TSB) e incubadas a 37 °C por 24 horas. Após esse período, os microrganismos foram semeados em placa contendo ágar TSA e incubados nas mesmas condições anteriormente citadas. Então, foram preparados os inóculos dos microrganismos indicadores em solução salina

0,9%, ajustando para 0,5 da escala de McFarland, que corresponde a 0,08 a 0,1 no comprimento de onda de 625 nm para *E. coli* e *S. aureus* e 530 nm para *C. albicans*, resultando em uma suspensão bacteriana de $1,5 \times 10^8$ UFC/mL (ANVISA, 2002; ANVISA 2008). Por fim, esses microrganismos foram semeados em forma de tapete, com auxílio de *swab* em placa com ágar Mueller Hinton (MH).

Discos de 9 mm de diâmetro foram cortados, com auxílio de uma ponteira de 1000 µL esterilizada, das placas de ágar contendo os microrganismos endofíticos e então foram depositados nas placas com ágar Mueller Hinton contendo os microrganismos indicadores. Essas placas foram incubadas a 37°C por 24 horas para posterior avaliação da formação de halos de inibição, que representam o resultado qualitativo da ação do endofítico testado sobre as cepas indicadoras.

Foram avaliados nessa triagem os microrganismos oriundos das espécies vegetais: *Xylopiya aromatica* e *Coffea arabica*. Uma observação importante é a de que os microrganismos endofíticos oriundos do café, como estavam armazenados a um considerável tempo, foram reativados em meios sem e com a adição de soro fetal bovino. O soro fetal bovino é um suplemento para meios de cultura celular, este contém uma grande quantidade de componentes como ácidos graxos, fatores de crescimento, aminoácidos e vitaminas. Seus componentes tem a finalidade de promover o crescimento das células. Normalmente é utilizado na concentração de 10% (JOHNSON; ANTONIELLE; MONCLARO, 2017). Para a finalidade de reativar os endofíticos aumentando sua produtividade o soro fetal bovino foi adicionado ao meio ISP2, mantendo uma concentração de 5%.

3.3 Padronização e produção do caldo fermentado

Tendo em vista que os componentes do substrato inicial são um dos fatores mais importantes que afetam a formação de metabólitos secundários por microrganismos, o experimento a seguir focou-se na avaliação do efeito das variáveis do processo, usando 3 diferentes meios de cultura (Tabela 3), para a avaliação da formação de biomassa e atividade antimicrobiana do caldo de fermentação.

Tabela 3: Quantidades e componentes presentes em cada um dos meios selecionados para este estudo. Valores expresso em (g/L).

MEIO TSB	MEIO ISP2	MEIO MGYP
Peptona de Caseína – 17 g/L	Extrato de malte – 10 g/L	Extrato de malte – 3 g/L
Peptona de Soja – 3 g/L	Extrato de levedura – 4 g/L	Extrato de levedura – 3 g/L
Glicose 2 g/L	Glicose – 4 g/L	Peptona – 5 g/L
Cloreto de sódio – 5 g/L		Glicose – 10 g/L
Fosfato dipotássico – 2,5 g/L		

Foram selecionados para essa etapa do estudo os microrganismos que apresentaram resultados positivos para mais de uma cepa potencialmente patogênica (Tabela 4), no teste de triagem realizado anteriormente, teste do bloco de gelose.

Tabela 4: Fonte de origem vegetal de onde cada microrganismo foi isolado e microrganismos que demonstraram melhor atividade.

<i>Coffea arabica</i>	<i>Enterobacter asburiae</i>
	<i>Pantoea agglomerans</i>
	<i>Pantoea dispersa</i>
	Rizo11c
	Rizo23c
<i>Xylopia aromatica</i>	Ef2p4
	Rizo07x

Todas as cepas citadas estão depositadas na coleção de culturas do Laboratório de Microbiologia e Biomoléculas (LaMiB) do Departamento de Morfologia e Patologia (DMP) Universidade Federal de São Carlos (UFSCar).

Todas as cepas foram cultivadas em placas de Petri contendo os meios TSB, MGYP e ISP2, os componentes e concentrações utilizados para a elaboração de cada um dos meios citados estão descritos na Tabela1. Estas

cepas foram semeadas em placas com os 3 diferentes meios pela técnica de esgotamento, as placas foram mantidas em estufa bacteriológica 48 e 168 horas à 28 °C, sendo o tempo de 168 horas para bactérias que apresentaram características de actinomicetos (NUNES, 2020).

A partir desses cultivos, obteve-se quatro colônias isoladas que foram adicionadas em 20 mL de seu respectivo caldo de cultivo. Estas foram incubadas 24 horas a 28 °C e 180 rpm ou até atingirem a densidade desejada, foi então retirado 1 mL destes para realizar a leitura de absorvância do caldo fermentado. Após a leitura ajustou-se a concentração da solução para 0.1 de absorvância 70% de transmitância, concentração de $1,5 \times 10^8$ UFC/mL (Anvisa, 2008).

$C1 = 0,978(\text{abs})$ cultivo de 24 horas

$C2 = 0,1$ (abs) concentração desejada

$V2 = 20 \text{ mL} = 20000 \mu\text{L}$ volume final

$$C1 \times V1 = C2 \times V2$$

$$V1 = \frac{C2 \times V2}{C1} = \frac{0.1(\text{abs}) \times 20000\mu\text{L}}{0.978(\text{abs})} = 2045\mu\text{L}$$

(volume do cultivo de 24 horas)

Equação 3: Cálculo para ajuste da concentração do pré-inoculo à 0,1 de absorvância.

Seguindo o exemplo, pipetou-se então 2045 μL desse caldo fermentado e completou-se com 17955 μL de solução salina fisiológica estéril, totalizando 20000 μL em uma concentração de 0.1 de absorvância. Com a concentração do inoculo inicial ajustada, foram transferidos 260 μL para um tubo de fundo cônico contendo 5 mL do meio de cultura desejado (5% v/v). Os tubos contendo os endofíticos inoculados nos diferentes meios foram incubados em shaker orbital à 28 °C, 180 rpm. Foram então determinados 21 diferentes caldos utilizando os 3 diferentes meios apresentados na (Tabela 3), para cada uma das 7 cepas apresentadas na (Tabela 4).

Para cada caldo fermentado a ser testado, foram preparados 13 tubos de fundo cônico que foram retirados em diferentes tempos para leitura de

absorbância e posteriores testes de atividade antimicrobiana, os tempos determinados foram: 12hs, 14hs, 16hs, 17hs, 18hs, 20hs, 22hs, 24hs, 48hs, 72hs, 96hs e 120hs. Para os microrganismos rizosféricos, os quais apresentam características de actinomicetos os tempos estabelecidos foram a princípio de 7, 14 e 21 dias (NUNES, 2020). Depois dessa etapa, cada caldo foi refeito e então foi analisado também os tempos de 2 dias antes e dois dias após cada actinomiceto apresentar bioatividade. Todo este procedimento em tubos tem por objetivo de reduzir o risco de contaminação ao pegar as amostras nos diferentes tempos, desta maneira só se retira o tubo respectivo no momento determinado anulando o manuseio do todo durante o experimento.

Após os caldos estarem prontos em seus respectivos tempos, os mesmos foram centrifugados a 10.000 rpm por 20 minutos e posteriormente filtrados para só então estarem prontos e serem utilizados para os testes antimicrobianos.

3.4 Curva de cinética bacteriana

O seguinte procedimento foi realizado para as linhagens já citadas anteriormente. Em uma microplaca de 96 poços (KASVI, BRA), pipetou-se 200 µL de meio de cultivo ISP2 como branco nos poços da primeira coluna, logo na segunda coluna adicionou-se a linhagem *Enterobacter asburiae*, a partir da suspensão bacteriana ajustada a 0,1 de absorbância, foram então pipetados 10 µL (5%v/v) dessa suspensão que foram depositados em cada um dos oito poços da segunda coluna, onde já haviam 190 µL de meio de cultivo ISP2.

Repetiu-se o mesmo procedimento para as outras linhagens estudadas e posteriormente para os outros dois diferentes meios: MGYB e TSB. A leitura da densidade ótica foi realizada em leitora de placas automática (TPReader NM-Thermo Plate). Para os actinomicetos a densidade ótica foi medida em espectrofotômetro (BIOSPECTRO SP-22).

Todos os tubos foram mantidos em shaker orbital a 180 rpm e 28 °C. Cada tudo foi retirado no seu devido tempo para processamento da amostra e posterior análise antimicrobiana.

3.5 Atividade antimicrobiana por difusão em ágar

Para realização dos testes antimicrobianos, todos os caldos fermentados foram filtrados em filtro para seringa, com membrana de celulose 0,22 µm

(KASVI) em tubos previamente esterilizados. Os caldos foram filtrados após centrifugação para a subtração de células bacterianas. Todos os ensaios de atividade antimicrobiana foram realizados em triplicata e os resultados expressos a partir dos halos de inibição foram obtidas através de uma média dos resultados obtidos em milímetros.

Para a avaliação da atividade antimicrobiana, as bactérias potencialmente patogênicas foram semeadas em meio Agar Triptico de Soja (TSA, KASVI) e cultivadas por 48 horas. Com o auxílio de um palito previamente esterilizado foi então retirado uma pequena alíquota de cada microrganismo utilizado, estas foram diluídas em tubos de ensaio contendo 5 mL de solução salina a 0,9% e ajustadas na escala 0,5 de Mc Farland em espectrofotômetro, que correspondem a $1,5 \times 10^8$ UFC/mL (Anvisa 2008). Foram utilizadas como cepas indicadoras os seguintes microrganismos: *C. albicans*, *E. coli* ATCC 5922, *S. aureus* ATCC 29213, todos pertencentes à coleção de microrganismos do Laboratório de Microbiologia e Biomoléculas.

Para o método de difusão em Ágar - Técnica do Disco e do Poço (GROVE e RANDALL, 1955), as placas contendo Ágar Mueller Hinton (MH, KASVI) preparadas antecipadamente, foram deixadas em repouso até atingir temperatura ambiente, posteriormente, com *swab* estéril, cada microrganismo potencialmente patogênico foi semeado em placa de Petri. Foram feitos poços de 9 mm de diâmetro com o uso da base de uma ponteira de 1000 μ L esterilizada. Em seguida, foi adicionado a cada poço 100 μ L do caldo a ser avaliado. Após todo o procedimento as placas foram incubadas durante 24 horas a 37 °C para posterior leitura qualitativa de formação de halo.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Isolamento a partir de *Xylopiá aromática*

No isolamento de microrganismos endofíticos foram isoladas 61 bactérias endofíticas a partir de *Xylopiá aromática*, das quais 03 eram de folha (4,9%), 04 do ramo (6,5%), 39 do fruto (63,9%) e 15 da rizosfera (24,6%), (Figura28).

Muitos estudos vêm isolando microrganismos endofíticos a partir de espécies vegetais encontradas no cerrado, estes microrganismos, sendo eles fungos ou bactérias, por sua vez demonstraram grande potencial biotecnológico. Pode-se citar dentre eles microrganismos endofíticos capazes de produzir moléculas de interesse clínico, com atividades antimicrobianas (ASSIS, 2018; MOREIRA, 2016; PIZA; HOKKA; SOUSA, 2015), antileishmanicida (NERIS et al., 2018) e também microrganismos endofíticos com grande potencial enzimático (MACHADO., 2019; TORRES, 2018);

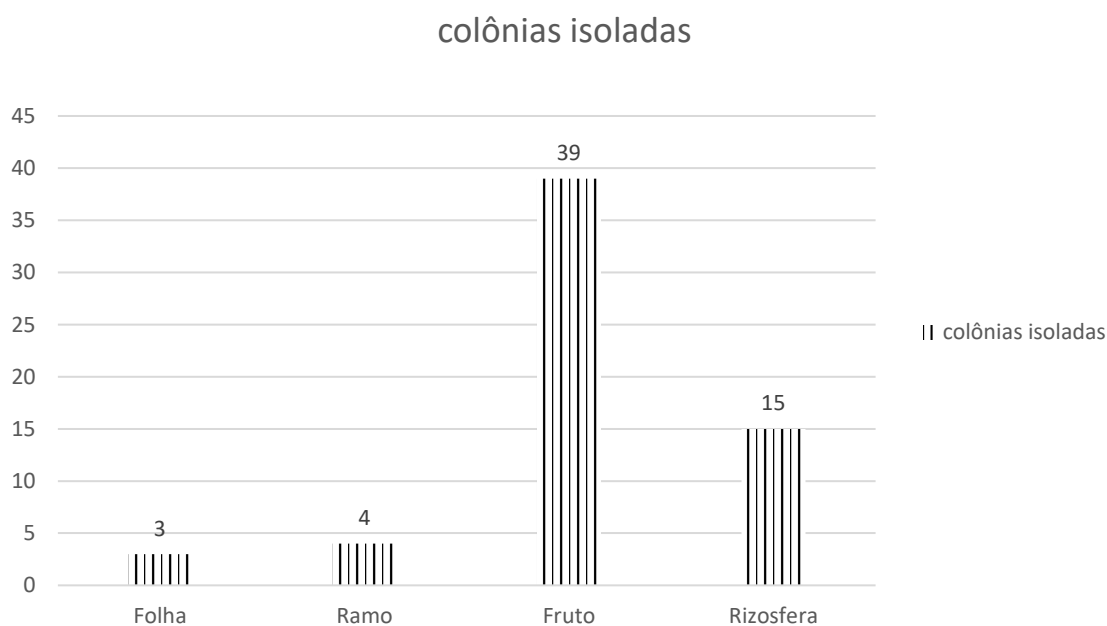


Figura 28: Resultado de colônias bacterianas obtidas a partir do isolamento de folha, ramo, fruto e rizosfera

A *Xylopiá aromática* é uma planta amplamente cultivada devido a suas flores brancas de aroma agradável. Além de seu uso na medicina popular como estimulante, carminativo e diurético é também utilizada em tratamentos de doenças digestivas e ainda tem seu espaço como especiarias para temperar e preservar carne. Suas folhas, frutos, caule e flores já foram estudados

analisando seus óleos essenciais (LAGO et al., 2003; MAIA et al., 2005; NASCIMENTO et al., 2018).

Em um estudo conduzido por Nascimento e colaboradores, 2018, a atividade antimicrobiana *in vitro* do óleo essencial obtido a partir das flores de *Xylopia aromatica* foi avaliada contra alguns microrganismos causadores de lesões cutâneas e apresentou atividade moderada contra *S. aureus*, *S. pyogenes* e *P. aeruginosa*. Quanto às propriedades antifúngicas, as folhas apresentaram atividade moderada contra *C. albicans*. Avaliando a composição química do óleo essencial da *Xylopia*, foram encontrados sesquiterpenos, estes por sua vez têm sido relatados em literatura como uma importante fonte de atividade antimicrobiana. Este e outros estudos relatando diversas atividades dessa espécie vegetal justificam a exploração do potencial dos microrganismos endofíticos presente em sua microbiota (NASCIMENTO et al., 2018).

4.2 Triagem da atividade antimicrobiana

4.2.1 *Xylopia aromatica*

Dos 61 isolados testados para cada um dos três microrganismos potencialmente patogênicos, (*S. aureus*, *E.coli* e *C. albicans*), por meio do teste do bloco de gelose, 3 produziram halo de inibição contra *S. aureus*, 5 apresentaram resultado positivo contra *C. albicans* e 2 apresentaram atividade contra *E. coli* (Tabela 5). Destes apenas 2 apresentaram resultados positivos para as duas cepas indicadoras e nenhuma das cepas isoladas apresentaram resultados positivos para as 3 cepas potencialmente patogênicas simultaneamente.

Tabela 5: Avaliação qualitativa da atividade antimicrobiana de microrganismos endofíticos isolados de *X. aromatica* frente a microrganismos potencialmente patogênicos: *S. aureus*, *E. coli*, *C. albicans*. Ausência de atividade (-), presença de atividade antimicrobiana.

Isolados	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>C. albicans</i>
EF1P1	+	-	-
EF2P1	-	-	+
EF2P4	-	+	+
Rizo07x	+	+	+
Rizo13x	-	-	+
Rizo19x	-	-	+

Rizo22x	+	-	-
---------	---	---	---

De tal forma, foram selecionados para testes posteriores as cepas nomeadas como EF2P4 e Rizo07x.

4.2.2 *Coffea arabica*

Dos 78 isolados, sendo 71 endofíticos e mais 7 rizosféricos do café (ANDRADE, 2019) testados para cada um dos três microrganismos potencialmente patogênicos, por meio do teste do bloco de gelose, 8 produziram halo de inibição contra *S. aureus*, 8 apresentaram resultado positivo contra *C. albicans* e 7 apresentaram atividade contra *E. coli* (Tabela 6).

Em um balanço geral 6 cepas apresentaram resultados positivos para todas as três bactérias potencialmente patogênicas utilizadas como triagem. Estes foram os isolados CRA241 (*Enterobacter asburiae*), CRA251 (*Enterobacter asburiae*), CRA250 (*Pantoea agglomerans*) CFO299 (*Pantoea dispersa*), Rizo11c e Rizo21c (os quais ainda não foram identificados), então foram selecionados para testes posteriores os endofíticos *P. agglomerans*, *P. dispersa*, *E. asburiae* e os microrganismos rizosféricos Rizo11c e Rizo21c. Das cepas que apresentaram resultados positivos, a CFO299 só apresentou halo de inibição contra as 3 cepas indicadoras, após reativada em meio TSB, suplemento com 5% de soro fetal bovino.

Tabela 6: Avaliação qualitativa da atividade antimicrobiana de microrganismos endofíticos isolados de *C. arabica* frente a microrganismos potencialmente patogênicos: *S. aureus*, *E. coli*, *C. albicans*. Ausência de atividade (-), presença de atividade antimicrobiana (+)

Isolados	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>C. albicans</i>
CFO299	+	+	+
CRA07	+	+	-
CRA08	+	-	+
CRA41	+	+	+
CRA50	+	+	+
CRA51	+	+	+

RZC07	-	-	+
Rizo11c	+	+	+
Rizo23c	+	+	+

Um importante adendo é de que as cepas CRA07 e CRA08, mesmo apresentando atividade após reativadas em meio suplementado com soro fetal bovino, exibiram um halo de inibição muito pequeno, assim excluindo as mesmas de testes posteriores.

Um estudo demonstrou, utilizando a técnica do bloco de gelose que, dentre 71 amostras de actinomicetos testadas, 18% apresentaram atividade antimicrobiana frente ao microrganismo-teste, *K. pneumoniae* ATCC 29665, após 24 horas de cultivo, e 22% após 48 horas de cultivo (CUNHA et al., 2010). Foi demonstrado também, por (FERREIRA et al., 2016) utilizando a mesma técnica, que a cepa de *Streptomyces sp G-27* apresentou atividade antimicrobiana contra cinco microrganismos testes, sendo eles: *S. aureus*, *E. faecium*, *E. coli*, *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae*.e *C. albicans*. O teste do bloco de gelose pode ser considerado como um teste simples para triagem de atividade antimicrobiana e ainda vem sendo empregado por diversos autores com tal finalidade (AMARAL et al., 2020).

Microrganismos isolados da espécie vegetal *Caryocar brasiliense*, também coletadas no cerrado da Ufscar, demonstram que de 42 isolados endofíticos testados para cada um dos três microrganismos potencialmente patogênicos, por meio do teste do bloco de gelose, 05 tiveram atividade contra *S. aureus*, 01 contra *C. albicans* para *E. coli* não foi observada nenhuma atividade (ASSIS, 2018).

Em um estudo conduzido por MOURA (2020), inicialmente 54 isolados fúngicos em estoque foram submetidos ao teste do bloco de gelose para triagem. Entre estes, apenas 7 (14,3%) apresentaram atividade contra as linhagens de microrganismos-teste, porém destes, apenas 4 seguiram no estudo. Após testar o caldo de fermentação obtido destes isolados fúngicos, muitos não apresentavam atividade. No presente estudo, também foi observado, que alguns microrganismos que tiveram bons resultados no teste do bloco de gelose, quando foram produzidos seus caldos fermentados, não mantiveram a atividade

que se esperava. Portanto esse teste deve ser revisado e cuidadosamente aplicado.

No estudo conduzido por (ANDRADE, 2019) o endofítico identificado como *Enterobacter asburiae*, apresentou: atividade contra dois fungos fitopatogênicos, *Fusarium axysporium* e *Fusarium solani* e potencial como indutor da promoção de crescimento vegetal e atividade enzimática. A espécie microbiana *P. agglomerans* apresentou potencial como indutor da promoção de crescimento vegetal e atividade enzimática, assim como cepas de *P. dispersa*. Ambas cepas neste estudo também apresentaram atividade antimicrobiana, obtida pela técnica do bloco de gelose para as três cepas potencialmente patogênicas já citadas.

Devido aos resultados obtidos com a triagem de atividade antimicrobiana, 5 cepas com maior potencial antimicrobiano foram selecionadas para continuidade do estudo, estas foram: *E. asburiae*, *P. agglomerans*, *P. dispersa* e mais duas cepas ainda não identificadas nomeadas de Rizo11c e Rizo23c.

4.3 Padronização pela técnica de cinética de crescimento bacteriano e atividade antimicrobiana dos caldos fermentados

Para o estudo e a avaliação da melhor técnica para preparação dos caldos fermentados foram realizadas as curvas de crescimento de cada uma das cepas citadas no tópico acima em 3 diferentes meios de cultivo (Figura 29). Para os microrganismos rizosféricos, os quais apresentaram características de actinomicetos, foram estabelecidos inicialmente os tempos de 7, 14, 21, 24 e 28 dias de cultivo (Figura 30), isso devido ao seu crescimento ser mais lento. Demais autores, quando trabalhando com actinomicetos também estabelecem tempos mínimos de cultivo superiores a 7 dias (CHEEPURUPALLI, et al., 2018; NUNES, 2020).

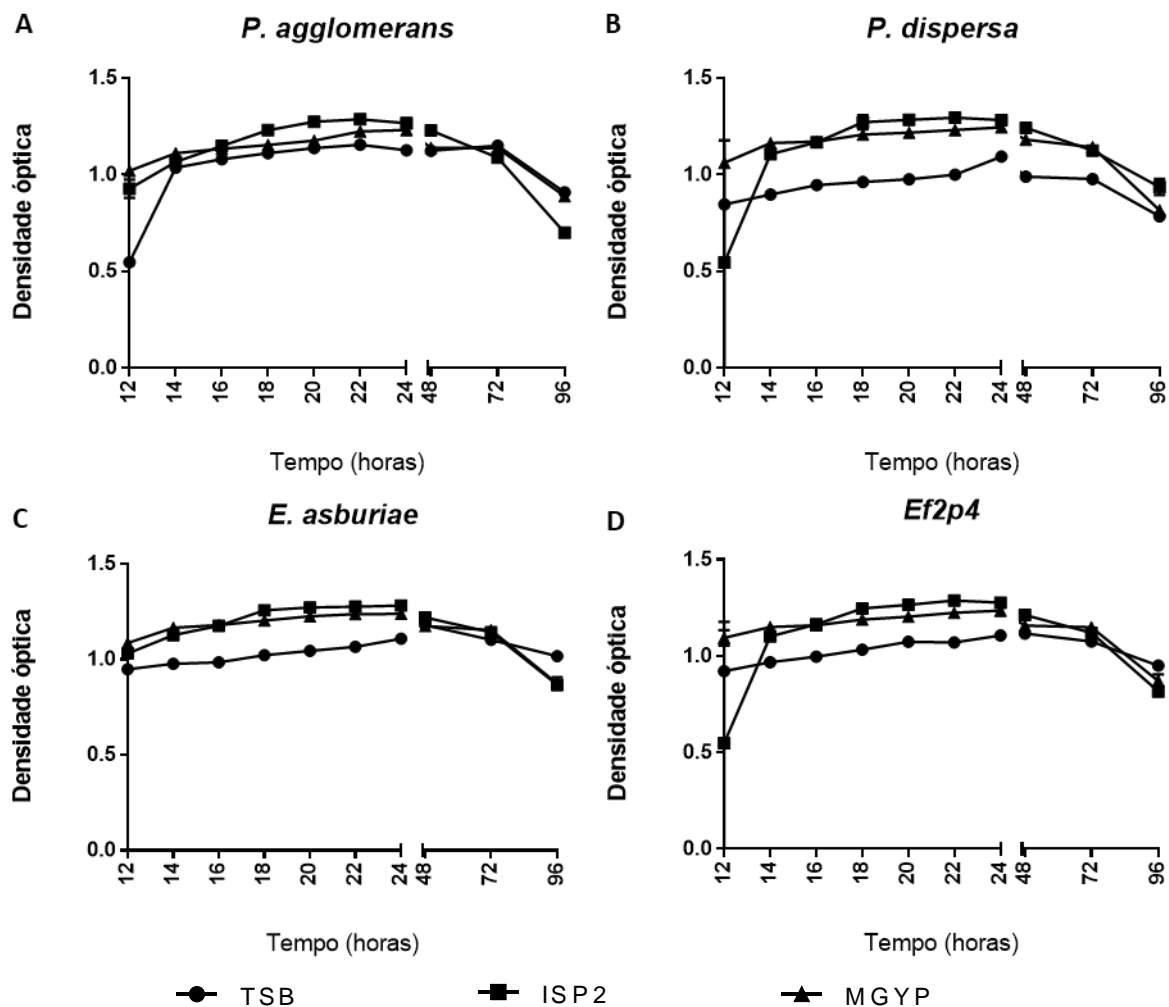


Figura 29: Médias da curva de cinética de crescimento das cepas pré-selecionadas em três diferentes meios de cultivo. A- Curva de crescimento *P. agglomerans*; B- Curva de crescimento *P. dispersa*; C- Curva de crescimento *E. asburiae*; D- Curva de crescimento do endofítico nomeado como Ef2p4.

O inóculo foi quantificado e padronizado por sua densidade óptica, após leitura ajustou-se a concentração da solução para 0,08 a 0.1 de absorbância, 70% de transmitância, concentração de $1,5 \times 10^8$ UFC/mL. Segundo (ASSIS, 2018), resultados obtidos a partir da curva de cinética de crescimento esboçada por densidade óptica do caldo fermentado demonstram uma boa correlação com a contagem microbiana em \log UFC/mL⁻¹, justificando assim, o uso da D.O como medida para avaliação do crescimento microbiano.

Podemos observar um comportamento similar de crescimento frente aos endofíticos testados. Se tratando do meio TSB, as cepas Ef2p4 e *E. asburiae* apresentaram o pico de crescimento em 48 horas, caindo bruscamente após 72

horas. Já a cepa *P. dispersa* apresentou seu pico de crescimento em 24 horas, caindo pouco até as 72 horas, onde também apresenta uma queda brusca. Para *P. agglomerans*, o crescimento se manteve estável entre 24 e 72 horas, onde também diminui bruscamente.

Em meio ISP2 as 4 cepas também se comportaram de maneira similar, apresentando um pico de crescimento entre 22 e 24 horas, onde a partir de então começa a diminuir sua D.O. Notamos também uma queda brusca a partir das 72 horas. O mesmo acontece quando analisamos a curva obtida a partir do cultivo em meio MGYP.

Quanto a atividade antimicrobiana, esta foi avaliada nos mesmos tempos em que se deu as leituras da curva de cinética de crescimento microbiano, para todas as variações testadas. O endofítico *P. agglomerans*, apresentou halo de inibição contra *S. aureus* quando seu caldo fermentado foi produzido em meio ISP2 de 20 à 24 horas. O caldo fermentado produzido a partir do endofítico *P. dispersa*, quando cultivado nos meios: MGYP e TSB apresentaram halos de inibição contra *E. coli* nos tempos de 72 e 96 horas quando em MGYP e 16 a 22 horas quando em TSB.

Desde os primeiros relatos do uso potencial industrial de metabólitos secundários produzidos por endófitos, há mais evidências de que as bactérias GRAM-positivas endofíticas são uma das fontes mais importantes de novos compostos que têm potencial comprovado para aplicações agrícolas, médicas e farmacêuticas, graças às suas atividades antimicrobiana e anticâncer (EK-RAMOS et al., 2019). No entanto observa-se neste estudo que os caldos fermentados produzidos por *Pantoea dispersa* e *Pantoea agglomerans* classificadas como GRAM-negativas, foram as que apresentaram atividade antimicrobiana. Este gênero por sua vez, já foi mencionada na literatura como produtora de metabólitos secundários produzindo uma variedade de antibióticos (WALTERSON; SMITH; STAVRINIDES, 2014).

Nesse estudo o caldo fermentado por *E. asburiae*, apresentou fraco halo de inibição, não demonstrando alta bioatividade. Porém em um outro estudo, essa mesma cepa apresentou valores de MIC entre 0,125 e 16 mg/mL⁻¹, seu extrato bruto mostrou atividade contra *M. smegmatis* e *E. coli* em concentrações

de $0,500 \text{ mg/mL}^{-1}$. Para *M. marinum* e *K. pneumonia* em concentrações de $0,125 \text{ mg/mL}^{-1}$. Esse extrato também apresentou atividade contra *S. aureus* e *B. cereus* (AKINSANYA; TING; MUINAT, 2017)

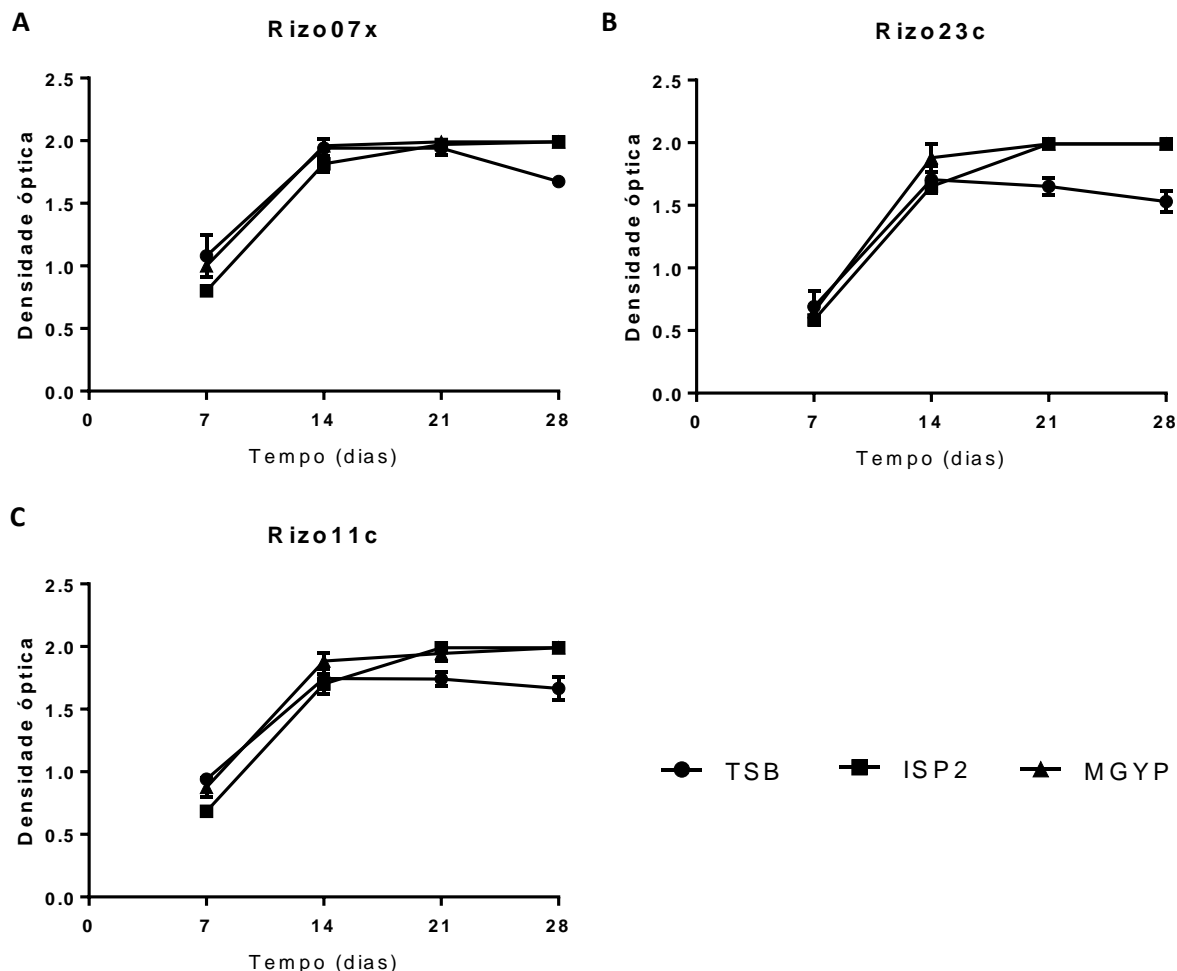


Figura 30: Curva de cinética de crescimento das cepas pré-selecionadas em três diferentes meios de cultivo. A- Curva de crescimento Rizo07x; B- Curva de crescimento Rizo23c; C- Curva de crescimento Rizo11c.

Se tratando dos microrganismos rizosféricos utilizados no presente estudo, ambos isolados são actinomicetos, estes por sua vez se adaptam aos mais diversos ambientes, estando em maior abundância no solo, podendo ser encontrados tanto na superfície, como a mais de 2 metros de profundidade (Goodfellow & Williams, 1983; NUNES, 2020).

O caldo fermentado produzido a partir dos microrganismos Rizo11c e Rizo23c, apresentaram bioatividade contra *S. aureus* e *E. coli*, respectivamente, nos tempos de 22, 23, e 24 dias de fermentação. Já a cepa Rizo07x, apresentou

bioatividade também contra cepas de *S. aureus*, *E. coli* e *C. albicans* no tempo de 14 dias de fermentação.

Em um estudo conduzido por (ROY; HALDER; BANERJEE, 2016), foi observado que após 8 dias de incubação, o endofítico *Streptomyces thermoviolaceus* entrou em fase estacionária, foi então que a produção de antimicrobianos aumentou acentuadamente. O meio ISP2 foi considerado como o meio de produção mais eficaz na produção dos metabólitos de interesse.

Com dados obtidos a partir de um estudo utilizando cepas de *P. polymyxa* foi definido que o valor da concentração inicial da fonte de carbono é similar com aquela de (16 g/L). O ajuste na concentração da fonte de carbono desempenha um papel importante na ativação do metabolismo secundário de *P. polymyxa*, o que resulta em uma produção ampliada de substâncias antimicrobianas, no qual a porcentagem de redução da CIM contra *E. coli* foi de 96,88% (SERRANO, 2014). Esse e outros dados apoiam a escolha dos diferentes meios utilizados no presente estudo, uma vez que os mesmos apresentam grande variação na concentração de fontes de carbono.

Corroborando com os resultados apresentados, afirma-se em diferentes estudos que os metabólitos secundários geralmente são sintetizados na fase estacionária ou no final da fase de crescimento do microrganismo, dando a entender que estes não desempenham funções essenciais no crescimento ou reprodução, mas conferem funções adaptativas aos organismos que os produzem. São extremamente diversificados e muitos atuam como antibióticos, pigmentos, toxinas e neuropeptídios (BALTZ, 2014; TORTORA; FUNKE; CASE, 2012).

5. CONCLUSÃO

Foram identificadas cepas endofíticas com atividade antimicrobiana nas duas espécies vegetais estudadas no presente trabalho. A *Coffea arabica* apresentou um maior número de microrganismos com potencial antimicrobiano em relação a *Xylopiá aromática*. Porém ambas possuem microrganismos endofíticos e rizosféricos que apresentam bioatividade contra cepas potencialmente patogênicas.

Um fator importante observado neste estudo foi em relação ao teste do bloco de gelose. Este vem sendo utilizado até os dias atuais como um teste para triagem de atividade antimicrobiana. Porém na grande maioria dos casos, as cepas que apresentaram bioatividade no teste, não apresentaram bioatividade significativa quando produzido o caldo fermentado a partir das mesmas. Assim, tal metodologia deve ser revisada e empregada cuidadosamente. Testes adicionais não descritos na tese foram realizados com o intuito de converter a falta de bioatividade dos caldos fermentados que foram produzidos com base nos resultados obtidos no teste da gelose. Foi realizado lise celular dos microrganismos antes do caldo ser centrifugado, assim como cultivo misto. Mesmo após estes procedimentos os caldos fermentados inicialmente sem bioatividade mantiveram-se sem a mesma.

Após análise de bioatividade podemos também concluir que dentre os microrganismos endofíticos e rizosféricos analisados o que se destaca em relação a sua bioatividade é o Rizo07x que apresentou bioatividade contra as três cepas testadas quando produzido em MGYP durante 14 dias de fermentação.

Referências

- ABBAS, S. et al. Advancement into the Arctic region for bioactive sponge secondary metabolites. **Marine Drugs**, v. 9, n. 11, p. 2423–2437, 2011.
- AKHOUNDI, M. et al. A Historical Overview of the Classification, Evolution, and Dispersion of Leishmania Parasites and Sandflies. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 10, n. 3, p. 1–40, 2016.
- AKINSANYA, A. M.; TING, A.; MUINAT, S. Extraction methods and TLC-bioautography for evaluation of antimicrobial activities of endophytic bacteria from medicinal plants. **LASU Journal of Medical Sciences**, v.2, n.1, p. 0–7, 2017.
- AKOPYANTS, N. S. et al. Expression profiling using random genomic DNA microarrays identifies differentially expressed genes associated with three major developmental stages of the protozoan parasite Leishmania major. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 136, n. 1, p. 71–86, 2004.
- ALMEIDA, M. et al. Staphylococcus aureus. **Mostra Científica em Biomedicina - Uicatólica**, v. 1, n. 1, p. 1-6, 2016.
- ALVAR, J. et al. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. **PLoS ONE**, v. 7, n. 5, p. 1-12, 2012.
- ALVIN, A.; MILLER, K. I.; NEILAN, B. A. Exploring the potential of endophytes from medicinal plants as sources of antimycobacterial compounds. **Microbiological Research**, n. 169, p. 483-495, January, 2014.
- AMARAL, S. S. et al. Potencial da atividade biológica de actinomicetos contra o fungo cryptococcus gatti, **Saúde e Ambiente, Interfaces científicas**, v.8, n.2, p. 2-271, 2020
- ANDRADE, P. H. M. **Análise da diversidade genética e potencial biotecnológico da comunidade bacteriana associada a Coffa arabica L. de cultivo convencional e orgânico**. 187f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2019.
- ANSTEAD, G. M. et al. Malnutrition alters the innate immune response and increases early visceralization following Leishmania donovani infection. **Infection and Immunity**, v. 69, n. 8, p. 4709–4718, 2001.
- ANVISA. OPAS/OMS Brasil - Folha informativa - 2018. Resistência aos antibióticos. Disponível em: <https://www.paho.org/bra/index.php?option=com_content&view=article&id=5664:folha-informativa-resistencia-aos-antibioticos&Itemid=812>. Acesso em: 23 de mai. 2020.
- APPIAH, T.; BOAKYE, Y. D.; AGYARE, C. Antimicrobial Activities and Time-Kill Kinetics of Extracts of Selected Ghanaian Mushrooms. **Hindawi, Evidence-**

based Complementary and Alternative Medicine, v. 2017, p. 1-15, 2017.

ARAÚJO, W. L. et al. Interaction between endophytes and plant host: Biotechnological aspects. In book: *Plant - Microbe interactions* v. 661, n. 2, p. 95–115, 2008.

ARISAWA, A.; WATANABE, A. Pursuing the unlimited potential of microorganisms-progress and prospect of a fermentation company. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v. 81, n. 1, p. 43–47, 2017.

ASH, C. et al. Phylogenetic heterogeneity of the genus *Bacillus* revealed by comparative analysis of small-subunit-ribosomal RNA sequences. **Letters in Applied Microbiology**, v. 13, p. 202–206, 1991.

ASSIS, P. C. P. **Bactérias endofíticas isoladas de *Caryocar brasiliense*: atividade enzimática, antimicrobiana, leishmanicida e co-cultura com microrganismos patogênicos**. 85f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia)- Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2018.

AZIZ, M. et al. Determination of antimicrobial effect of protamine by transmission electron microscopy and SDS PAGE on *Pseudomonas aeruginosa* isolates from diabetic foot infection. **Iranian Journal of Basic Medical Sciences**, v. 22, n. 7, p. 827–832, 2019.

BARBOSA, S. DA S. et al. Antagonist activity of bacteria associated with the soil of the municipality of Iranduba. **Brazilian Journal of Development**, v. 7, n. 5, p. 45099–45109, 2021.

BATISTA, B. **Piracicaba 2012**. Promoção de crescimento em milho (*Zea Mays* L.) por rizobactérias associadas a cultura de guaranazeiro (*Paullinia cupana* var. *sorblis*) 129f. Dissertação (Mestre em Ciência) - Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2012.

BIANCHI, J. et al. Antigenotoxic potential of the fermentation broth produced by *Paenibacillus polymyxa* RNC-D in vitro. **Future Microbiology**, v. 16, n. 7, p. 471–485, 2021.

BRANDAO, M. G. L.; GRAEL, C. F. F.; FAGG, C. W. European Naturalists and Medicinal Plants of Brazil. **Biological Diversity and Sustainable Resources Use**, PhD. Oscar Grillo (ed). 2011.

BRESCÓ, M. S. et al. Pathogenic mechanisms and host interactions in *Staphylococcus epidermidis* device-related infection. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, n. 1401, p. 1-24, Ago. 2017.

CAVICCHIOLI, R. **Potencial biotecnológico do *Paenibacillus polymyxa* RNC-D, endofítico isolado de *Prunus* sp.(Cerrado), para atividade antimicrobiana e inflamação aguda**. 90f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2017.

CDC - Centers for Disease Control and Prevention, 2019. Biggest Threats and Data | Antibiotic/Antimicrobial Resistance | CDC. Disponível em: <https://www.cdc.gov/drugresistance/biggest-threats.html?CDC_AA_refVal=https%3A%2F%2Fwww.cdc.gov%2Fdrugresistance%2Fbiggest_threats.html>. Acesso em: 26 mai. 2020.

CHAGAS, F. O. **Cultura mista, manipulação química e genética de micro-organismos: estratégias para a diversificação do metabolismo secundário**. 371f. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2014.

CHAKRAVARTY, J.; SUNDAR, S. Drug resistance in leishmaniasis. **Journal of Global Infectious Diseases**, v. 2, n. 2, p. 167, 2010.

CHEN, P. et al. Community composition and metabolic potential of endophytic actinobacteria from coastal salt marsh plants in Jiangsu, China. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, n. 1063, p. 1–16, Mai. 2019.

CHINEDUM, I. E. Microbial resistance to antibiotics. **African Journal of Biotechnology**, v. 4, n. 13 SPEC. ISS., p. 1606–1611, 2005.

COLLEMARE, J. et al. Biosynthesis of secondary metabolites in the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*: the role of hybrid PKS-NRPS in pathogenicity. **Mycological Research**, v. 112, n. 2, p. 207–215, 2008.

COURRET, N. et al. Biogenesis of *Leishmania*-harbouring parasitophorous vacuoles following phagocytosis of the metacyclic promastigote or amastigote stages of the parasites. **Journal of Cell Science**, v. 115, n. 11, p. 2303–2316, 2002.

CUETO, M. et al. Pestalone, a new antibiotic produced by a marine fungus in response to bacterial challenge. **Journal of Natural Products**, v. 64, n. 11, p. 1444–1446, 2001.

CUNHA, M. N. C. et al. Actinomicetos produtores de inibidores de β -lactamases com atividade antimicrobiana frente a isolados de mastite bovina. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 62, n. 6, p. 1312–1319, 2010.

DA CRUZ, P. L. R. et al. Metabolic screening for PKS and NRPs in endophytic actinobacteria from *Citrus reticulata*. **Química Nova**, v. 38, n. 3, p. 333–341, 2015.

DAVID, B.; WOLFENDER, J. L.; DIAS, D. A. The pharmaceutical industry and natural products: historical status and new trends. **Phytochemistry Reviews**, v. 14, n. 2, p. 299–315, 2015.

DEMAIN, A. L. Industrial microbiology. **Current Opinion in Microbiology**, v. 214, n. 3, p. 253–254, 1981.

DENG, A. et al. Production of xylo-sugars from corncob by oxalic acid-assisted ball milling and microwave-induced hydrothermal treatments. **Industrial Crops and Products**, v. 79, p. 137–145, 2016.

DIGGLE, S. P.; WHITELEY, M. Microbe profile: *Pseudomonas aeruginosa*: Opportunistic pathogen and lab rat. **Microbiology (United Kingdom)**, v. 166, n. 1, p. 30–33, 2020.

EK-RAMOS, M. J. et al. Bioactive products from plant-endophytic Gram-positive bacteria. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, n. 463, p. 1–12, Mar. 2019.

ELBORN, J. S. Cystic fibrosis. **The Lancet**, v. 388, n. 10059, p. 2519–2531, 2016.

ELIOPOULOS, G. M.; ELIOPOULOS, C. T. Antibiotic combinations: Should they be tested? **Clinical Microbiology Reviews**, v. 1, n. 2, p. 139–156, 1988.

ETESAMI, H.; MAHESHWARI, D. K. Use of plant growth promoting rhizobacteria (PGPRs) with multiple plant growth promoting traits in stress agriculture: Action mechanisms and future prospects. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 156, p. 225–246, Jan. 2018.

FENG, P.; WANG, Z.; YU, X. Predicting antimicrobial peptides by using increment of diversity with quadratic discriminant analysis method. **IEEE/ACM Transactions on Computational Biology and Bioinformatics**, v. 16, n. 4, p. 1309–1312, 2017.

FERREIRA, H. K. L. et al. Avaliação in vitro do potencial antimicrobiano de *Streptomyces* sp. G-27 contra microrganismos de interesse clínico. **Anais do Congresso Nordestino de Biólogos - Congrebio 2016**, v. 6, p. 316, 2016.

FIOCRUZ - Fundação Oswaldo Cruz. É um milagre- Penicilina, Disponível em: <<http://www.invivo.fiocruz.br/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?infoid=811&sid=7>>. Acesso em: 26 Mai. 2020.

FOURNIER, G. et al. Chemical and biological studies of *Xylopia aromatica* stem bark and leaf oils. **Planta Medica**, v. 60, n. 3, p. 283–284, 1994.

FOURNIER, G.; LEBOEUF, M.; CAVÉ, A. Annonaceae essential oils: A review. **Journal of Essential Oil Research**, v. 11, n. 2, p. 131–142, 1999.

FOURNIER, M. F. et al. Force transmission in migrating cells. **Journal of Cell Biology**, v. 188, n. 2, p. 287–297, 2010.

FRANK, A.; SALDIERNA GUZMÁN, J.; SHAY, J. Transmission of Bacterial Endophytes. **Microorganisms**, v. 5, n. 4, p. 70, 2017.

FREITAS, G. D.; FELIPE, D.; COELHO, S. Uso de diferentes métodos no controle do desenvolvimento do *Staphylococcus aureus* : uma revisão da literatura Use of different methods to control the development of

Staphylococcus aureus : a literature review Uso de diferentes métodos para controlar el de. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 2, p. 1–8, 2021.

FREITAS, P. R. et al. Characterization and antibacterial activity of the essential oil obtained from the leaves of *Baccharis coridifolia* DC against multiresistant strains. **Microbial Pathogenesis**, v. 145, p. 104223, Mar. 2020.

FRIERI, M.; KUMAR, K.; BOUTIN, A. Antibiotic resistance. **Journal of Infection and Public Health**, v. 10, n. 4, p. 369–378, 2017.

GAST, R.; PORTER, R. John Wiley & Sons, Inc. - Salmonella infections - **Diseases of poultry**, Ed. 14, Edit by David E. Swayne, p. 719–730, 2020.

GAUCHAN, D. P. et al. Evaluation of antimicrobial, antioxidant and cytotoxic properties of bioactive compounds produced from endophytic fungi of Himalayan yew (*Taxus wallichiana*) in Nepal. **F1000Research**, v. 9, p. 1–28, 2020.

GIULIANI, A.; PIRRI, G.; NICOLETTO, S. F. Antimicrobial peptides: An overview of a promising class of therapeutics. **Central European Journal of Biology**. v. 2, n. 1, p. 1-33, Fev. 2007.

GOLINSKA, P. et al. Endophytic actinobacteria of medicinal plants: Diversity and bioactivity. **Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology**, v. 108, n. 2, p. 267–289, 2015.

GONZÁLEZ, J. et al. Ferramentas metodológicas in vitro para o estudo do câncer e seleção de novas substâncias antitumorais. **Revista de Educação, Ciência e Tecnologia do IFRS**, v. 7, n. 3, p. 22–40, 2020.

GOSSAGE, S. M.; ROGERS, M. E.; BATES, P. A. Two separate growth phases during the development of *Leishmania* in sand flies: Implications for understanding the life cycle. **International Journal for Parasitology**, v. 33, n. 10, p. 1027–1034, 2003.

GRADY, E. N. et al. Current knowledge and perspectives of *Paenibacillus*: A review. **Microbial Cell Factories**, v. 15, n. 1, p. 1–18, 2016.

GRAF, B. A.; MILBURY, P. E.; BLUMBERG, J. B. Flavonols, flavones, flavanones, and human health: Epidemiological evidence. **Journal of Medicinal Food**, v. 8, n. 3, p. 281–290, 2005.

GROVE, A. C.; RANDALL, W. A. (New York Medical Encyclopedia). Serie: Antibiotics monographs n2. Nova York, p. 408, 1955.

GUBIANI, J. **Bioprospeção de fungos endofílicos- *Camarops* sp., *Periconia atropurpurea* e *Pseudofusicoccum stromaticum* e avaliação epigenética de *Phoma* sp.** 225f. Tese (Doutorado em Química) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Araraquara, 2015.

GUNATILAKA, A. A. L. Natural Products from Plant-associated Microorganisms: Di. **J Nat Prod**, v. 69, n. 3, p. 509–526, 2012.

GUO, C. et al. Application of Bayesian techniques to model the burden of human salmonellosis attributable to U.S. food commodities at the point of processing: Adaptation of a Danish model. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 8, n. 4, p. 509–516, 2011.

HAQUE, M. U. et al. Modulation of antibacterial activity of actinomycetes by co-culture with pathogenic bacteria. **Bangladesh Pharmaceutical Journal**, v. 18, n. 1, p. 61–65, 2015.

HENARD, C. A. et al. Leishmania amazonensis Amastigotes Highly Express a Tryparedoxin Peroxidase Isoform That Increases Parasite Resistance to Macrophage Antimicrobial Defenses and Fosters Parasite Virulence. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 8, n. 7, 2014.

HUTCHINSON, C. R. Microbial polyketide synthases: More and more prolific. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 96, n. 7, p. 3336–3338, 1999.

HWANG, G. et al. Candida albicans mannans mediate Streptococcus mutans exoenzyme GtfB binding to modulate cross-kingdom biofilm development in vivo. **PLoS Pathogens**, v. 13, n. 6, p. 1–25, 2017.

ICHIKAWA, T. et al. Improvement of kasugamycin-producing strain by the agar piece method and the prototroph method. **Folia Microbiologica**, v. 16, n. 3, p. 218–224, 1971.

JIANG, Y. et al. Recent advances of biofuels and biochemicals production from sustainable resources using co-cultivation systems. **Biotechnology for Biofuels**, v. 12, n. 1, p. 1–12, 2019.

JOHNSON, M.; ANTONIELLE, T.; MONCLARO, V. Labome 2016 - **Soro Fetal Bovino**. Disponível em: <<http://www.labome.com.br/method/Fetal-Bovine-Serum.html>>. Acesso em: 15, Jun. 2018.

JORGENSEN, S. et al. Correlating microbial community profiles with geochemical data in highly stratified sediments from the Arctic Mid-Ocean Ridge. **Pnas Plus**, v. 109, n. 42, p. 1–10, 2012.

JUSTUS, C. R. et al. In vitro cell migration and invasion assays. **Journal of Visualized Experiments**, n. 88, p. 1–8, 2014.

KAMDEM, R. S. T. et al. Induction of new metabolites from the endophytic fungus Bionectria sp. through bacterial co-culture. **Fitoterapia**, v. 124, p. 132–136, Ago. 2018.

KIM, S. YOUNG et al. Surfactin from *Bacillus subtilis* displays anti-proliferative effect via apoptosis induction, cell cycle arrest and survival signaling suppression. **FEBS Letters**, v. 581, n. 5, p. 865–871, 2007.

KNIGHT, V. et al. Diversifying microbial natural products for drug discovery. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 62, n. 5–6, p. 446–458, 2003.

LAGO, J. H. G. et al. Analysis, comparison and variation on the chemical composition from the leaf volatile oil of *Xylopi aromatic* (Annonaceae). **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 31, n. 6, p. 669–672, 2003.

LEÓN, F. M. V.; FREIRE, N. C. N.; VILLAVICENCIO, A. D. M. Evaluación de la actividad antimicrobiana del extracto hidroalcohólico obtenido de la semilla de lino (*Linum Usita- tissimum*), frente a *Salmonella typhimurium* (ATCC 14028) y *Salmonella typhi* (ATCC 9298). **RECIAMUC**, v. 4, n. 1, p. 314-325, 2020.

LETUNIC, I. et al. iPath: interactive exploration of biochemical pathways and networks. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 33, n. 3, p. 101–103, 2008.

LIMA, R. B. S. et al. In vitro and in vivo anti-malarial activity of plants from the Brazilian Amazon. **Malaria Journal**, v. 14, n. 1, p. 1–14, 2015.

LODEWYCKX, C. et al. Endophytic bacteria and their potential applications. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 21, n. 6, p. 583–606, 2002.

MACHADO., P. C. **Diversidade e potencial biotecnológico da comunidade bacteriana associada ao Pinhão -Manso (*Jatropha curcas* L.)**. 149f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2019.

MACIEL-REZENDE, C. M. et al. Synthesis and biological evaluation against *Leishmania amazonensis* of a series of alkyl-substituted benzophenones. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 21, n. 11, p. 3114–3119, 2013.

MAIA, J. G. S. et al. Leaf volatile oils from four Brazilian *Xylopi* species. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 20, n. 5, p. 474–477, 2005.

MAJOLO, C. et al. Atividade antimicrobiana do óleo essencial de rizomas de açafrão (*Curcuma longa* L.) e gengibre (*Zingiber officinale* Roscoe) frente a salmonelas entéricas isoladas de frango resfriado. **Revista Brasileira de Plantas Medicin**ais, v. 16, n. 3, p. 505–512, 2014.

MAJOUMOUO, M. S. et al. Cytotoxicity Potential of Endophytic Fungi Extracts from *Terminalia catappa* against Human Cervical Cancer Cells. **Journal of Toxicology**, v. 2020, 2020.

MARTÍ, M. et al. Protective face mask filter capable of inactivating SARS-CoV-2, and methicillin-resistant staphylococcus aureus and staphylococcus epidermidis. **Polymers**, v. 13, n. 2, p. 1–12, 2021.

MARTINS, A. L. **História do café**. 2. ed. São Paulo, Ed. Contexto, 320p. 2012.

MELLATA, M. Human and avian extraintestinal pathogenic escherichia coli: Infections, zoonotic risks, and antibiotic resistance trends. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 10, n. 11, p. 916–932, 2013.

MMA - Ministério do Meio Ambiente. **O Bioma Cerrado**. Disponível em: <<https://www.mma.gov.br/biomas/cerrado>>. Acesso em: 26 mai. 2020.

MOHAMED, G. A.; IBRAHIM, S. R. M.; ASFOUR, H. Z. Antimicrobial metabolites from the endophytic fungus *Aspergillus versicolor*. **Phytochemistry Letters**, v. 35, p. 152–155, Fev. 2020.

MOHAMED, S. et al. Antibacterial effects of antibiotics and cell-free preparations of probiotics against *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* associated with conjunctivitis. **Saudi Pharmaceutical Journal**, v. 28, n. 12, p. 1558–1565, 2020.

MORAES, M. P. L.; ROQUE, N. F. Diterpenes from the fruits of *Xylopia aromatica*. **Phytochemistry**, v. 27, n. 10, p. 3205–3208, 1988.

MOREIRA, C. C. **Bioprospecção de fungos endofíticos de Manguezais com atividade antimicrobiana, enzimática, antiparasitária e antitumoral**. 78f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2016.

MORGENSTERN, M. et al. Antibiotic resistance of commensal *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative staphylococci in an international cohort of surgeons: A prospective point-prevalence study. **PLoS ONE**, v. 11, n. 2, p. 1–16, 2016.

MULUYE, D. et al. Types and drug susceptibility patterns of bacterial isolates from eye discharge samples at Gondar University Hospital, Northwest Ethiopia. **BMC Research Notes**, v. 7, n. 1, p. 1–5, 2014.

NASCIMENTO, M. N. G. et al. Chemical Composition and Antimicrobial Activity of Essential Oils from *Xylopia aromatica* (Annonaceae) Flowers and Leaves. **Revista Virtual de Química**, v. 10, n. 5, p. 1546–1561, 2018a.

NASCIMENTO, M. N. G. . et al. Effect of sodium nitrite as a corrosion inhibitor in reinforced concrete in the presence of CO₂ and chloride. **Revista Virtual de Química**, v. 10, n. 5, p. 1546–1561, 2018b.

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, p. 1–11, 2018.

NETT, M.; IKEDA, H.; MOORE, S. Genomic basis for natural product biosynthetic diversity in the actinomycetes. **Duke Mathematical Journal**, v. 26, n. 11, p. 1362–1384, 2009.

NIELSEN, P.; SORENSEN, J. Multi-target and medium independent fungal antagonism by hydrolytic enzymes in *Paenibacillus polymyxa* and *Bacillus pumilus* strains from barley rhizosphere. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 22, p. 183–192, 1997.

NWOZO, S. O.; OROJOBI, B. F.; ADARAMOYE, O. A. Hypolipidemic and antioxidant potentials of *Xylopiya aethiopica* seed extract in hypercholesterolemic rats. **Journal of Medicinal Food**, v. 14, n. 1–2, p. 114–119, 2011.

OLIVEIRA, V. B. et al. Chemical composition and inhibitory activities on dipeptidyl peptidase IV and pancreatic lipase of two underutilized species from the Brazilian Savannah: *Oxalis cordata* A.St.-Hil. and *Xylopiya aromatica* (Lam.) Mart. **Food Research International**, v. 105, p. 989–995, Nov. 2018.

OMS - Organização Mundial de Saúde - OPAS/OMS Brasil - OMS publica lista de bactérias para as quais se necessitam novos antibióticos urgentemente. 2018, Disponível em:
<https://www.paho.org/bra/index.php?option=com_content&view=article&id=5357:oms-publica-lista-de-bacterias-para-as-quais-se-necessitam-novos-antibioticos-urgentemente&Itemid=812>. Acesso em: 26 maio. 2020.

ONAKA, H. Novel antibiotic screening methods to awaken silent or cryptic secondary metabolic pathways in actinomycetes. **Journal of Antibiotics**, v. 70, n. 8, p. 865–870, 2017.

ONGENA, M.; JACQUES, P. *Bacillus* lipopeptides: versatile weapons for plant disease biocontrol. **Trends in Microbiology**, v. 16, n. 3, p. 115–125, 2008.

PAERL, H. W.; PINCKNEY, J. L. A mini-review of microbial consortia: Their roles in aquatic production and biogeochemical cycling. **Microbial Ecology**, v. 31, n. 3, p. 225–247, 1996.

PATEL J.B.; et al., M07-A10: Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; **CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute)**, v. 35, n. 2, 2015.

PELLISSARI, D. M. et al. Tratamento da Leishmaniose Visceral e Leishmaniose Tegumentar Americana no Brasil. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 20, n. 1, p. 107–110, 2011.

PERIM, M. C. et al. In vitro antibacterial and time-kill assay of ethanolic extract of *Davilla nitida* bark on multidrug resistant bacteria isolated from diabetic foot lesions. **Natural Product Research**, v. 33, n. 16, p. 2383–2388, 2019.

PETERS, B. M.; SHIRTLIFF, M. E.; JABRA-RIZK, M. A. Antimicrobial peptides: Primeval molecules or future drugs? **PLoS Pathogens**, v. 6, n. 10, p. 4–7, 2010.

PETERSEN, C. A.; GREENLEE, M. H. W. Neurologic Manifestations of

Leishmania spp. Infection . **Journal of Neuroparasitology**, v. 2, n. VI, p. 1–5, 2011.

PIZA, A.; HOKKA, C.; SOUSA, C. Endophytic Actinomycetes from *Miconia albicans* (Sw.) Triana (Melastomataceae) and Evaluation of Its Antimicrobial Activity. **Journal of Scientific Research and Reports**, v. 4, n. 4, p. 281–291, 2015.

PYE, C. R. et al. Retrospective analysis of natural products provides insights for future discovery trends. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 114, n. 22, p. 5601–5606, 2017.

QUADT-HALLMANN, A.; KLOEPPER, J. W.; BENHAMOU, N. Bacterial endophytes in cotton: mechanisms of entering the plant. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 43, n. 6, p. 577–582, 1997.

QUEIROZ, J. C. C. et al. Evaluation of the anti-inflammatory and antinociceptive effects of the essential oil from leaves of *Xylopia laevigata* in experimental models. **Scientific World Journal**, v. 2014, n. 816450, p. 1-11, 2014.

QUINTANS, J. S. S. et al. Chemical constituents and anticancer effects of the essential oil from leaves of *Xylopia laevigata*. **Planta Medica**, v. 79, n. 2, p. 123–130, 2013.

RAAIJMAKERS, J. M. et al. Natural functions of lipopeptides from *Bacillus* and *Pseudomonas*: More than surfactants and antibiotics. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 34, n. 6, p. 1037–1062, 2010.

RABA, D. N. et al. Investigation on crude and high-temperature heated coffee oil by ATR-FTIR spectroscopy along with antioxidant and antimicrobial properties. **PLoS ONE**, v. 10, n. 9, p. 1–20, 2015.

RICCI ET AL, M. DOS S. F. Embrapa, **Cultivo orgânico do café: Recomendações técnicas**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2002.

ROSSOLINI, G. M. et al. Update on the antibiotic resistance crisis. **Current Opinion in Pharmacology**, v. 18, p. 56–60, 2014.

ROY, S.; HALDER, S. K.; BANERJEE, D. Multi-Response Optimization of Granaticinic Acid Production by Endophytic *Streptomyces thermoviolaceus* NT1 , Using Response Surface Methodology. **Bioengineering**, V. 3, n. 19, p. 1–11, 2016.

RUSSO, T. A.; JOHNSON, J. R. Medical and economic impact of extraintestinal infections due to *Escherichia coli*: Focus on an increasingly important endemic problem. **Microbes and Infection**, v. 5, n. 5, p. 449–456, 2003.

RYAN, R. P. et al. Bacterial endophytes: Recent developments and applications. **FEMS Microbiology Letters**, v. 278, n. 1, p. 1–9, 2008.

SAHOO, S.; SUBBAN, K.; CHELLIAH, J. Diversity of Marine Macro-Algicolous Endophytic Fungi and Cytotoxic Potential of *Biscogniauxia petrensis* Metabolites Against Cancer Cell Lines. **Frontiers in Microbiology**, v. 12, n. Jun. 2021.

SALEHI, B. et al. Therapeutic potential of α -and β -pinene: A miracle gift of nature. **Biomolecules**, v. 9, n. 11, p. 1–34, 2019.

SANGLARD, D. Emerging threats in antifungal-resistant fungal pathogens. **Frontiers in Medicine**, v. 3, p. 1–10, Mar. 2016.

SANTOS, D. M. **Materiais não tecidos à base de poli(ϵ -caprolactona)/cloreto de N-(2-hidroxil)-propil-3- trimetilamônio quitosana: Desenvolvimento por Eletrofiliação, Caracterização Físico-Química e Avaliação citotóxica in vitro**. 120f. Tese (Doutorado em Ciências) - Universidade de São Paulo, São Carlos, 2018.

SCHARFF, R. L. Economic burden from health losses due to foodborne illness in the united states. **Journal of Food Protection**, v. 75, n. 1, p. 123–131, 2012.

SCHMIDT, R. et al. Fungal volatile compounds induce production of the secondary metabolite Sodorifen in *Serratia plymuthica* PRI-2C. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 1–14, 2017.

SCHNEIDER, P.; MISIEK, M.; HOFFMEISTER, D. In vivo and in vitro production options for fungal secondary metabolites. **Molecular Pharmaceutics**, v. 5, n. 2, p. 234–242, 2008.

SERRANO, N. F. G. **Purificação e caracterização bioquímica de substâncias bioativas produzidas por endófito isolado de *Prunus* spp.** 65f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2009.

SERRANO, N. F. G. **Produção de compostos antimicrobianos por *Paenibacillus polymyxa* - RNC-D. Otimização das condições de cultivo, purificação e caracterização dos bioprodutos**. 248f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2014.

SHAN, W. et al. Endophytic actinomycetes from tea plants (*Camellia sinensis*): Isolation, abundance, antimicrobial, and plant-growth-promoting activities. **BioMed Research International**, v. 2018, p. 1-12, 2018.

SINGH, R.; DUBEY, A. K. Diversity and applications of endophytic actinobacteria of plants in special and other ecological niches. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, p. 1-30, Ago. 2018.

SINGH, S.; YOUNG, A.; MCNAUGHT, C. E. The physiology of wound healing. **Surgery (United Kingdom)**, v. 35, n. 9, p. 473–477, 2017.

SMALL, J. V.; HERZOG, M.; ANDERSON, K. Actin filament organization in the

fish keratocyte lamellipodium. **Journal of Cell Biology**, v. 129, n. 5, p. 1275–1286, 1995.

SOMMER, L. M.; MOLIN, S.; JOHANSEN, H. K. J. Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* and adaptation to complex dynamic environments. **Microbial Genomics**, v. 47, n. 1, p. 57–64, 2020.

SOUZA, C. N. DE; ALMEIDA, A. C. DE; MARTINS, E. R. Atividade Antimicrobiana De Plantas Mediciniais Do Cerrado. **Revista Unimontes Científica**, v. 19, n. 2, p. 51–61, 2017.

SOUZA, I. F. **Prospecção de substâncias com atividade antagonista à candida albicans produzidas por bactéria endofítica da região amazônica**. 79f. Dissertação (Mestre em Biotecnologia) - Universidade Federal do Amazonas - Manaus, 2016

STASHENKO, E. E.; JARAMILLO, B. E.; MARTÍNEZ, J. R. Analysis of volatile secondary metabolites from Colombian *Xylopiia aromatica* (Lamarck) by different extraction and headspace methods and gas chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1025, n. 1, p. 105–113, 2004.

STROBEL, G. et al. Natural Products from Endophytic Microorganisms. **Journal of Natural Products**, v. 67, n. 2, p. 257–268, 2004.

STROBEL, G. et al. *Urnula* sp., an Endophyte of *Dicksonia antarctica*, Making a Fragrant Mixture of Biologically Active Volatile Organic Compounds. **Microbial Ecology**, v. 74, n. 2, p. 312–321, 2017.

STROBEL, G.; DAISY, B. Bioprospecting for Microbial Endophytes and Their Natural Products. **MICROBIOLOGY AND MOLECULAR BIOLOGY REVIEWS**, v. 67, n. 4, p. 491–502, abr. 2003.

STROMBERG, Z. R. et al. Evaluation of *Escherichia coli* isolates from healthy chickens to determine their potential risk to poultry and human health. **PLoS ONE**, v. 12, n. 7, p. 1–18, 2017.

TANG, Z. et al. Isolation and identification of flavonoid-producing endophytic fungi from medicinal plant *Conyza blinii* H.Lév that exhibit higher antioxidant and antibacterial activities . **PeerJ**, v. 8, p. 8978, 2020.

TORRES, F. L. **Isolamento, caracterização e potencial biotecnológico de fungos endofíticos associados à plantas do cerrado**. 86f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2018.

TREPAT, X.; CHEN, Z.; JACOBSON, K. Cell migration. **Comprehensive Physiology**, v. 2, n. 4, p. 2369–2392, 2012.

TRIPATHI, V. C. et al. Natural products from polar organisms: Structural diversity, bioactivities and potential pharmaceutical applications. **Polar Science**,

v. 18, p. 147–166, Jan. 2018.

UNG, L. et al. The best of all worlds: *Streptococcus pneumoniae* conjunctivitis through the lens of community ecology and microbial biogeography. **Microorganisms**, v. 8, n. 1, 2020.

WALTERSON, A. M.; SMITH, D. D. N.; STAVRINIDES, J. Identification of a *Pantoea* Biosynthetic Cluster That Directs the Synthesis of an Antimicrobial Natural Product. **Plos One**, v. 9, n. 5, p. 1–12, 2014.

WANG, E. X. et al. Reorganization of a synthetic microbial consortium for one-step vitamin C fermentation. **Microbial Cell Factories**, v. 15, n. 1, p. 1–11, 2016.

WANG, H.; SIVONEN, K.; FEWER, D. P. Genomic insights into the distribution, genetic diversity and evolution of polyketide synthases and nonribosomal peptide synthetases. **Current Opinion in Genetics and Development**, v. 35, p. 79–85, 2015.

WANG, Z. R. et al. Induced production of steroids by co-cultivation of two endophytes from *Mahonia fortunei*. **Steroids**, v. 145, p. 1–4, Jan. 2019.

WERNER, S.; KRIEG, T.; SMOLA, H. Keratinocyte-fibroblast interactions in wound healing. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 127, n. 5, p. 998–1008, 2007.

WESTERINK, W. M. A.; SCHOONEN, W. G. E. J. Phase II enzyme levels in HepG2 cells and cryopreserved primary human hepatocytes and their induction in HepG2 cells. **Toxicology in Vitro**, v. 21, n. 8, p. 1592–1602, 2007a.

WESTERINK, W. M. A.; SCHOONEN, W. G. E. J. Cytochrome P450 enzyme levels in HepG2 cells and cryopreserved primary human hepatocytes and their induction in HepG2 cells. **Toxicology in Vitro**, v. 21, n. 8, p. 1581–1591, 2007b.

WHITE, J. F. et al. Elsevier Inc. Chapter 9, **Evidence for Widespread Microbivory of Endophytic Bacteria in Roots of Vascular Plants Through Oxidative Degradation in Root Cell Periplasmic Spaces**, PGPR Amelioration in Sustainable Agriculture. 2018. 27p.

WHO. **WHO | Leishmaniasis** - Disponível em: <<https://www.who.int/leishmaniasis/en/>>. Acesso em: 26 maio. 2020.

WU, G. et al. Metabolic Burden: Cornerstones in Synthetic Biology and Metabolic Engineering Applications. **Trends in Biotechnology**, v. 34, n. 8, p. 652–664, 2016.

ZHANG, L. et al. Induction of diverse bioactive secondary metabolites from the mangrove endophytic fungus *Trichoderma* sp. (strain 307) by co-cultivation with *Acinetobacter johnsonii* (strain B2). **Marine Drugs**, v. 15, n. 2, p. 1–14, 2017.

ZHANG, S. et al. Interkingdom microbial consortia mechanisms to guide biotechnological applications. **Microbial Biotechnology**, v. 11, n. 5, p. 833–847, 2018.

ZHOU, K. et al. Distributing a metabolic pathway among a microbial consortium enhances production of natural products. **Physiology & behavior**, v. 176, n. 1, p. 139–148, 2016.