

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

CENTRO DE BIOTECNOLOGIA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

**METABÓLITOS PRODUZIDOS POR BACTÉRIAS MARINHAS COM
ATIVIDADE ANTIFORMAÇÃO DE BIOFILME PATOGÊNICO**

Tese de Doutorado

Nicole Sartori Ribeiro

Porto Alegre, setembro de 2021

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

CENTRO DE BIOTECNOLOGIA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

**METABÓLITOS PRODUZIDOS POR BACTÉRIAS MARINHAS COM
ATIVIDADE ANTIFORMAÇÃO DE BIOFILME PATOGÊNICO**

Nicole Sartori Ribeiro

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular do Centro de Biotecnologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para obtenção do Grau de Doutora em Biologia Celular e Molecular.

Orientador: Alexandre José Macedo

Porto Alegre, setembro de 2021

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Biofilmes & Diversidade Microbiana, situado no Centro de Biotecnologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Para seu desenvolvimento, este trabalho contou com o fomento da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do RS (FAPERGS).

*"In one drop of water are found the secrets of
all the endless oceans"*

Kahlil Gibran

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer inicialmente ao meu orientador, Alexandre Macedo, por todo o conhecimento, paciência e compreensão que ele me dedicou ao longo desses 4 anos (e meio), transpassando uma pandemia e todas as adaptações que tiveram que ser realizadas no decorrer do desenvolvimento desse trabalho.

Agradeço ao professor Carlos Termignoni, pelo espaço cedido dentro de seu laboratório para a execução dessa tese e por toda a sabedoria transmitida. E claro, pelos cafezinhos compartilhados.

A todos os meus colegas do laboratório 213, 217N (campus do Vale) e 707 da Faculdade de Farmácia da UFRGS, com quem tive o grande prazer de partilhar conhecimentos científicos e apoio emocional ao longo desses anos. Muitos não são apenas colegas, mas sim amigos queridos que levo para a vida. Aproveito também para agradecer aos colegas do Programa de Pós-graduação (PPGBCM), incluindo os laboratórios 220, 217 (prédio 42431) e 214 (prédio 43431), que me auxiliaram muito intelectualmente.

À técnica Viviane Nunes da Silva Anselmo pelo suporte técnico que foi essencial para a realização dos experimentos com modelo *in vivo* e por tornar os dias mais divertidos e leves pelo seu jeito alegre e espontâneo de ser. Agradeço também aos funcionários da Secretaria do PPGBCM, especialmente à Silvinha, pelo auxílio prestado sempre que solicitado.

Aos meus pais, Celi e Jorge, por sempre me apoiarem e acreditarem no meu potencial. Se hoje concluo esse doutorado, devo isso a vocês. À minha irmã, Jéssica, que é minha referência, meu apoio, meu porto seguro. Obrigada por sempre estar do meu lado, mesmo que fisicamente distante.

Às minhas amigas da faculdade de biomedicina que foram muito presentes ao longo dessa jornada, dando dicas e apoio moral, assim como minhas amigas de infância e aos poucos

e bons amigos que fiz ao longo dos anos, no qual foram emocionalmente muito importantes para mim. Sou muito grata e sortuda por ter tantas pessoas que amo ao meu redor.

RESUMO

Biofilmes são comunidades de células microbianas recobertas por uma matriz de substâncias extracelulares (EPS), encontradas aderidas às superfícies, como dispositivos médicos. Essas estruturas são responsáveis por causar diversas doenças infecciosas humanas. A terapia antivirulência tem sido estudada como uma alternativa para combater infecções resistentes, já que visa inibir fatores de virulência ao invés de matar microrganismos, diminuindo a pressão seletiva. Nesse contexto, moléculas marinhas tem se destacado por sua bioatividade. Portanto, esse estudo teve como objetivo identificar novos metabólitos produzidos por microrganismos marinhos com atividade contra o biofilme de bactérias patogênicas. Inicialmente, um rastreamento com oito bactérias isoladas de esponjas marinhas -coletadas da costa brasileira- foi realizado e atividades antibióticas ou antibiofilme de seis bactérias (202, 208, 256, 266, BMPV40 e BMPV Mel) foram encontradas contra espécies de *Staphylococcus* spp. ou *Pseudomonas aeruginosa*. Moléculas menores do que 30 kDa produzidas pelo isolado 208 (*Priestia* sp.) inibiram o biofilme de *S. aureus* sem interferir no seu crescimento, reduzindo até 92% do biofilme após precipitação de proteínas. A origem proteica dos compostos ativos foi confirmada por testes de inativação por calor e tripsina, seguido por etapas de microscopia, cromatografia e espectrometria de massas. As proteínas parcialmente purificadas (PPP) exibiram ação antibiofilme com concentração mínima de 4 µg/mL e a atividade foi confirmada visualmente por microscopia óptica e microscopia eletrônica de varredura (MEV). PPP não apresentou toxicidade contra *Galleria mellonella* e eritrócitos humanos. Além disso, uma das frações cromatográficas (nº 24) mostrou-se ativa, sendo identificada uma metalopeptidase com propriedades proteolíticas dependentes de zinco na sua composição. Portanto, a presente tese evidenciou o potencial biotecnológico de bactérias associadas às esponjas marinhas, destacando as atividades antibiótica e antibiofilme de seus metabólitos.

Palavras-chave: biofilme, *Priestia* spp., bactéria marinha, peptidase, terapia antivirulência

ABSTRACT

Biofilms are communities of microbial cells enclosed in a self-produced matrix of exopolymeric substances (EPS) attached to biotic or abiotic surfaces, such as medical device. Biofilms are responsible for causing a variety of infection diseases in humans. In this view, antivirulence therapy has been evaluated as an alternative to combat resistant infections, since it aims to inhibit virulence factors instead of killing the microorganisms (main responsible for bacteria resistance acquirement). In this context, marine molecules from microorganisms have been highlighted by its biological activities. Thus, this study aimed to identify new bioactive metabolites from marine microorganisms with antibiofilm activity against pathogenic bacteria. First, a screening with eight marine bacteria isolated from marine sponges collected in Brazilian coast was performed and antibiotic or antibiofilm activities from six bacteria were found against *Staphylococcus* spp. or *Pseudomonas aeruginosa*. Molecules smaller than 30 kDa secreted by 208 strain (*Priestia* sp.) inhibited biofilm without interfere in *S. aureus* growth, reducing 92% of biofilm mass after protein concentration. The proteinaceous origin of active compound was confirmed by heat shock assay and trypsin inactivation, followed by microscopy techniques, chromatography and mass spectrometry assays. Partial-purified proteins (PPP) showed antibiofilm activity with 4 µg/mL of minimum concentration and its effect was visualized by optical microscopy and Scanning Electron Microscopy (SEM). PPP was not toxic to *Galleria mellonella* and human erythrocytes. Furthermore, the fraction nº 24 from anion-exchange chromatography showed bioactivity, in which it was indicated to be constituted by a metallopeptidase with zinc-dependent proteolytic characteristics. Therefore, this thesis showed the biotechnological potential of marine sponge-associated bacteria metabolites, highlighting its antibiotic and antibiofilm activities.

Keywords: biofilm, *Priestia* spp., marine bacteria, peptidase, antivirulence therapy.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Compostos com atividade antimicrobiana distribuídos entre os gêneros bacterianos associados às esponjas marinhas.	24
Figura 2. Linha do tempo da descoberta dos antibióticos eficientes contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas.	30
Figura 3. Descrição das etapas de formação do biofilme bacteriano.)	38
Figura 4. Organização e proteção proporcionadas pelo biofilme..	40
Figura 5. Sinalização do <i>quorum sensing</i> (QS)..	42
Figura 6. Principais fatores de virulência de <i>S. aureus</i>	44
Figura 7. Fatores de virulência bacterianos como potencial alvo de terapia antivirulência.57	
Figura 8. Etapas de formação do biofilme bacteriano.	57
Figura 9. Resumo dos resultados obtidos na presente tese.	139

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Produtos naturais produzidos por bactérias marinhas com atividade antimicrobiana contra cepas de <i>Staphylococcus</i> spp. resistentes e outros patógenos de importância clínica.....	21
Tabela 2. Lista produzida pela Organização Mundial da Saúde (OMS) com os microrganismos prioridades para estudo contra sua resistência à antimicrobianos.....	27
Tabela 3. Mecanismo de resistência das principais classes de antibióticos.....	32
Tabela 4. Principais proteínas MSCRAMMs de <i>S. aureus</i>	44
Tabela 5. Fatores envolvidos nas diferentes etapas de desenvolvimento do biofilme entre as bactérias patogênicas <i>S. aureus</i> , <i>S. epidermidis</i> e <i>P. aeruginosa</i>	52
Tabela 6. Metabólitos secundários produzidos por bactérias marinhas com atividade contra o biofilme de bactérias patogênicas.....	59

LISTA DE ABREVIATURAS

Aap: do inglês, *associated protein*

AGE: do inglês, *aminoglycoside modifying enzymes*

AIP: do inglês, *autoinducing peptide*

AI-2: autoindutor 2

AMPs: do inglês, *antimicrobial peptides*

ARG: do inglês, *antibiotic resistance genes*

AU: do inglês, *arbitrary units*

Aur:do inglês, *aureolysin*

BHI: *Brain Heart Infusion*

BHL: do inglês, N-butyrylhomoserine lactone

Bhp: do inglês, *biofilm associated homolog protein*

CDC: do inglês, *Centers for Disease Control and Prevention*

CFU: do inglês, *colony-forming units*

CHIPS: do inglês, *chemotaxis-inhibitory protein of Staphylococcus*

DNA: ácido desoxirribonucleico

DP: desvio padrão

DRSA: do inglês, *daptomycin-resistant Staphylococcus aureus*

EBF: extratos brutos fracionados

eDNA: DNA extracelular

EDTA: do inglês, *ethylenediamine tetraacetic acid*

Embp: do inglês, *extracellular matrix binding protein*

EPI: Equipamentos de Proteção Individual

EPS: do inglês, *extracellular polymeric substances*

ESKAPE: *Enterococcus faecium, Staphylococcus aureus, Klebsiella pneumoniae, Acinetobacter baumannii, Pseudomonas aeruginosa e Enterobacter spp.*

EUA: Estados Unidos da América

h: hour/hora

HGT: do inglês, *horizontal gene transfer*

HIV: do inglês, *human immunodeficiency virus*

kDa: kilodalton

L-PG: do inglês, *lysyl-phosphatidylglycerol*

LPS: lipopolissacarídeo

MBIC: do inglês, *minimal biofilm inhibitory concentration*

MDRO: do inglês, *multidrug-resistant organisms*

MES: do inglês, *2-[N-morpholino] ethanesulfonic acid*

mg: miligramas

MH: *Muller Hinton*

mL: mililitros

mM: milimolar

MNP: do inglês, *marine natural products*

MRSA: do inglês, *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus*

MSCRAMMS: do inglês, *microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules*

MSSA: do inglês, *Methicillin-susceptible Staphylococcus aureus*

MTT: do inglês, (3-[4,5-dimethyl-thiazol-2-yl] -2,5 - diphenyltetrazolium)

nm: nanômetros

OD: do inglês, *optical density*

OdDHL: do inglês, *acylhomoserine lactone N-(3-oxododecanoyl) -homoserine lactone*

OMS: Organização Mundial da Saúde

PAMPs: do inglês, *pathogen-associated molecular pattern*

PBP: do inglês, *penicillin binding protein*

PBP2a: proteína ligadora de penicilina 2^a

PHEN: *1,10 phenanthroline*

PNAG: polissacarídeo de superfície N-acetil-D-glicosamina

PPP: do inglês, *partial purified proteins*

PSGL-1: *P-selectin glycoprotein ligand-1*

PSMs: *staphylococcal phenol-soluble modulins*

QS: *Quorum Sensing*

RDP: do inglês, *Ribosomal Database Project*

RNA: ácido ribonucleico

rpm: rotações por minuto

ROS: do inglês, *Reactive Oxygen Species*

SAK: *Staphylokinase*

SD: do inglês, *standard deviation*

SpA: *surface proteína A*

SSL5: *superantigen-like protein 5*

TCEP: *tris-2-carboxyethyl-phosphine*

TLR: *toll-like receptors*

TSB: *Tryptic Soy Broth*

UFC: unidades formadoras de colônia

UTI: Unidade de Terapia Intensiva

VRSA: do inglês, *vancomycin-resistant Staphylococcus aureus*

µg: microgramas

µL: microlitros

µM: micromolar

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO GERAL	15
1.1 Produtos naturais com potencial biotecnológico	16
1.2 Ambiente marinho como fonte de novas moléculas	18
1.2.1 MOLÉCULAS ANTIBIÓTICAS	20
1.2.2 ESPONJAS MARINHAS E BACTÉRIAS ASSOCIADAS	22
1.3 Infecções resistentes e seu impacto na sociedade	26
1.4 Antibióticos e seus mecanismos de ação	29
1.5 Resistência bacteriana aos antibióticos	31
1.6 Fatores de virulência bacteriana	34
1.6.1 ADESINAS	36
1.6.2 BIOFILME	36
1.6.2.1 <i>QUORUM SENSING</i>	41
1.7 <i>Staphylococcus aureus</i>	42
1.7.1 FATORES DE VIRULÊNCIA DE <i>Staphylococcus aureus</i>	43
1.7.2 MECANISMOS DE RESISTÊNCIA DE <i>Staphylococcus aureus</i>	47
1.7.3 BIOFILME DE <i>Staphylococcus aureus</i>	49
1.8 <i>Staphylococcus epidermidis</i>	52
1.9 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	54
1.10 Terapia antivirulência	55
1.10.1 MOLÉCULAS ANTIBIOFILME	57
2. OBJETIVOS	62
2.1 OBJETIVOS GERAL	63
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	63
3. RESULTADOS	64
3.1 CAPÍTULO I	66
3.2 CAPÍTULO II	85
4. DISCUSSÃO GERAL	135
5. CONCLUSÕES GERAIS	148
REFERÊNCIAS	150
APÊNDICE A - EXPERIMENTOS ADICIONAIS	168
ANEXO A - LIVRO BIOTECNOLOGIA MARINHA	178
ANEXO B - <i>CURRICULUM VITAE resumindo</i>	202

1. INTRODUÇÃO GERAL

1.1 Produtos naturais com potencial biotecnológico

Produtos naturais são definidos como moléculas produzidas por uma fonte natural com atividades biológicas, como metabólitos secundários que são compostos produzidos por organismos e microrganismos - majoritariamente por fungos, bactérias, plantas e animais marinhos -, os quais são descritos como moléculas não essenciais para o seu crescimento, desenvolvimento ou reprodução, porém promovem uma vantagem de defesa para sua sobrevivência no ambiente (KATZ; BALTZ, 2016; MELANDER; BASAK; MELANDER, 2020; SILVA; ZIMMER; MACEDO; TRENTIN, 2016). Os metabólitos secundários mais conhecidos são os antibióticos, que atuam como protetores, aumentando a sobrevivência dos organismos em uma competição com outras espécies vivas, como no caso de disputa entre microrganismos por um espaço no ambiente, regulando, então, essas interações entre espécies (DEMAIN; FANG, 2000; GIORDANO; COPPOLA; RUSSO; DENARO *et al.*, 2015). Em genomas microbianos, os genes de uma via de biossíntese de metabólitos secundários tendem a ser dispostos próximos uns dos outros no cromossomo, e esses conjuntos gênicos são responsáveis pela síntese e expressão desses metabólitos de acordo com estímulos do ambiente, sendo mediados por cascatas regulatórias complexas. As vantagens seletivas da funcionalidade desses operons incluem a correção de vários genes simultaneamente e a transferência desses conjuntos via horizontal ou vertical (FEWER; METSÄ-KETELÄ, 2020; GIORDANO; COPPOLA; RUSSO; DENARO *et al.*, 2015).

Já os metabólitos primários são definidos como produtos sintetizados por organismos durante a sua fase de crescimento (fase exponencial no caso dos microrganismos), pois são essenciais para o seu desenvolvimento, abrangendo classes de proteínas, carboidratos, lipídeos, vitaminas e nucleotídeos (ABDEL-AZIZ; ABO ELSOUD; ANISE, 2017). Constituintes proteicos presentes nesses extratos representam uma fonte promissora de moléculas biologicamente ativas, já que apresentam vantagens como apresentar interações específicas

únicas com outras moléculas devido à complexidade de seu tamanho e estrutura, além de serem uma fonte de grande diversidade química ainda não caracterizadas (O'KEEFE, 2001). De qualquer forma, extratos brutos de produtos naturais são misturas complexas, nas quais há interação entre inúmeros compostos, sendo eles metabólitos primários e secundários (HARVEY; EDRADA-EBEL; QUINN, 2015).

Os produtos naturais são utilizados na área terapêutica há muitos anos para o tratamento de diversas doenças, como infecções, tumores, doenças cardíacas, neurológicas e metabólicas, sendo que exemplos desses produtos incluem paclitaxel (antineoplásico), norgestrel (hormônio), digitoxigenina (cardioglicosídeo) e penicilina, estreptomicina, cefalosporina (antibióticos) (LAUTIÉ; RUSSO; DUCROT; BOUTIN, 2020). Segundo Newman & Cragg (2020), desde 1981 até 2019, 1881 novas drogas de origem natural ou sintéticas baseados em estruturas naturais foram aprovados para o tratamento de doenças humanas, evidenciando o potencial biotecnológico desses produtos. Dentre essas moléculas, 3,8% (71) são produtos naturais inalterados, isto é, sem qualquer modificação estrutural e 18,4% (346) referem-se à macromoléculas isoladas, majoritariamente proteínas e peptídeos, produzidas por organismos, linhagens celulares ou hospedeiros (NEWMAN; CRAGG, 2020).

Moléculas naturais são potenciais fontes de compostos bioativos pois apresentam uma estrutura química mais complexa, com arranjos estereoquímicos inovadores, apresentando uma maior massa molecular, maior número de átomos de carbono e oxigênio, além de maior número de aceptores e doadores de ligações de hidrogênio, hidrofobicidade e maior rigidez molecular – que facilita a interação proteína-proteína - comparado com compostos sintéticos (ATANASOV; ZOTCHEV; DIRSCH; SUPURAN *et al.*, 2021; BUTLER, 2004; MELANDER; BASAK; MELANDER, 2020; RODRIGUES; REKER; SCHNEIDER; SCHNEIDER, 2016). Entretanto, apesar das vantagens dos compostos naturais, incluindo essa diversidade química e facilidade de penetração no interior de células bacterianas, os compostos

sintéticos são amplamente utilizados na clínica médica. Estes são mais favoráveis para a industrialização, pois metabólitos bioativos muitas vezes apresentam baixa abundância, rendimento e a própria complexidade da molécula pode trazer instabilidade. Sendo assim, é comum drogas sintéticas serem inspiradas na estrutura química de compostos naturais, as quais podem ser baseadas na modificação da estrutura química original, visando uma redução da toxicidade e melhora da efetividade (RODRIGUES; REKER; SCHNEIDER; SCHNEIDER, 2016; WRIGHT, 2014).

Nesse contexto, 58% dos antibióticos e 32% de fármacos antitumorais aprovados entre 1985 e 2020 para uso clínico são oriundos de produtos naturais ou de seus derivados semissintéticos (FEWER; METSÄ-KETELÄ, 2020; NEWMAN; CRAGG, 2016). Dentre os principais produtores de antibióticos, os microrganismos se destacam devido a produção de compostos alternativos oriundos da evolução natural e pressão seletiva, o que resulta na diversificação das vias biossintéticas, originando moléculas potentes como terpenos, sacarídeos, policetídeos, alcalóides e peptídeos (FEWER; METSÄ-KETELÄ, 2020; GENILLOUD, 2019). Os microrganismos marinhos, por sua vez, são a fonte mais recente de produtos naturais bioativos comparado com microrganismos terrestres (JIMÉNEZ, 2018). Nos últimos 50 anos, mais de 30.000 produtos naturais marinhos foram encontrados e aproximadamente 2% foram isolados de organismos habitantes do fundo do mar (TORTORELLA; TEDESCO; PALMA ESPOSITO; JANUARY *et al.*, 2018).

1.2 Ambiente marinho como fonte de novas moléculas

Cerca de 70% da área do planeta é coberta por oceanos, sendo que espécies marinhas representam aproximadamente metade da biodiversidade global (CHEUNG; NG; WONG, 2015). O ambiente marinho é considerado uma fonte rica de novos compostos devido às suas condições químicas e físicas desfavoráveis, como: (1) altas concentrações de sódio

(salinidade); (2) baixas temperaturas (abaixo de 4 °C); (3) altas pressões - a pressão aumenta 1 atmosfera (atm) a cada 10 metros de profundidade no oceano, variando, portanto, de 20 atm até >1000 atm; (4) variação na concentração de oxigênio, dependente do balanço entre a sua disponibilidade e a sua taxa de consumo; (5) variação da intensidade da luz, que diminui proporcionalmente à profundidade oceânica devido à absorção ou espalhamento dos fótons. Todos esses fatores favorecem a produção de uma ampla variedade de moléculas com estruturas únicas pelos seus habitantes (DE CARVALHO; FERNANDES, 2010; JIMÉNEZ, 2018; ROMANO; COSTANTINI; SANSONE; LAURITANO *et al.*, 2017; TORTORELLA; TEDESCO; PALMA ESPOSITO; JANUARY *et al.*, 2018). Contudo, devido as dificuldades de exploração dos oceanos decorrente da sua profundidade, estima-se que ainda há muitos compostos bioativos promissores desconhecidos (CHEUNG; NG; WONG, 2015; JIMÉNEZ, 2018).

Alguns medicamentos aprovados e utilizados atualmente no tratamento de doenças humanas foram isolados de organismos marinhos, como trabectedina, um antitumoral isolado da *Tunicata Ecteinascidia turbinata*, citarabina isolado da esponja marinha *Cryptotethya crypta* e utilizado para tratar leucemia, e vidarabina, um antiviral isolado da esponja *Tethya crypta* (JIMENEZ; WILKE; COSTA-LOTUFO, 2018; SAGAR; KAUR; MINNEMAN, 2010; SHINDE; BANERJEE; MANDHARE, 2019). Compostos com ação quimioterápica, antitumoral, contra dores crônicas e hiperlipidemia, e especialmente antibiótica, com potencial de atuar sobre bactéria patogênicas resistentes, também já foram isolados de microrganismos marinhos. Dentre esses metabólitos estão derivados de aminoácidos e nucleosídeos, macrolídeos, terpenóides, esterol, porfirinas e compostos alifáticos cíclicos (MELANDER; BASAK; MELANDER, 2020; ROMANO; COSTANTINI; SANSONE; LAURITANO *et al.*, 2017), e algumas dessas moléculas isoladas de fungos, bactérias e invertebrados, majoritariamente, estão em fase de teste clínico (JIMÉNEZ, 2018).

1.2.1 MOLÉCULAS ANTIBIÓTICAS

Moléculas antibióticas capazes de atuar contra bactérias patogênicas multirresistentes e/ou moléculas efetivas contra fatores de virulência bacteriana são visadas por pesquisas que realizam a triagem com esses microrganismos marinhos (BORGES; SIMÕES, 2019; DE CARVALHO; FERNANDES, 2010). Nos últimos anos, o actinomiceto do gênero *Streptomyces* foi a bactéria com maior número de novos compostos químicos identificados, com 137 metabólitos reportados durante o ano de 2017, seguido por *Pseudoalteromonas*, *Nocardiopsis* e *Bacillus* com 16, 15 e 14 moléculas, respectivamente (BLUNT; CARROLL; COPP; DAVIS *et al.*, 2018; CARROLL; COPP; DAVIS; KEYZERS *et al.*, 2019). Na tabela 1 encontram-se descritos alguns produtos naturais produzidos por bactérias marinhas com atividade contra cepas resistentes de *Staphylococcus* spp. e outras bactérias patogênicas até o ano de 2016, ilustrando seu potencial biotecnológico.

Tabela 1. Produtos naturais produzidos por bactérias marinhas com atividade antimicrobiana contra cepas de *Staphylococcus* spp. resistentes e outros patógenos de importância clínica.

Composto	Classe	Bactéria produtora	Atividade antibiótica	Ref
Abyssomicin C	Policetídeo	<i>Verrucosispora</i> sp. (AB 18-032) (amostra de sedimento do mar japonês)	MRSA; <i>S. aureus</i> resistente à vancomicina	(BISTER; BISCHOFF; STRÖBELE; RIEDLINGER <i>et al.</i> , 2004)
Ansalactams B–D	Policetídeos	<i>Streptomyces</i> sp. (CNH189)	MRSA	(LE; YANG; YOON; NAM <i>et al.</i> , 2016); (BLUNT; CARROLL; COPP; DAVIS <i>et al.</i> , 2018);
Anthracimycin	Policetídeo	<i>Streptomyces</i> sp. sp (CNH365)	MRSA	(CHU; WANG; ZHAO; ZHANG <i>et al.</i> , 2019)
Caboxamycin	Alcalóide	<i>Streptomyces</i> sp. (NTK 937)	<i>S. epidermidis</i>	(HOHMANN; SCHNEIDER; BRUNTNER; IRRAN <i>et al.</i> , 2009)
Desotamide	Ciclo-hexapeptídeo	<i>Streptomyces scopuliridis</i> (SCSIO ZJ46)	<i>S. epidermidis</i> resistente à metilina (MRSE)	(SONG; LI; LIU; CHEN <i>et al.</i> , 2014) (TORTORELLA; TEDESCO; PALMA ESPOSITO; JANUARY <i>et al.</i> , 2018)
Etamycin	Peptídeo cíclico	<i>Actinomycete</i> sp. (CNS-575)	MRSA	(LIU; EL-HOSSARY; OELSCHLAEGER; DONIA <i>et al.</i> , 2019)
Lobophorin F e H	Policetídeos	<i>Streptomyces</i> sp. (SCSIO 01127)	<i>S. aureus</i> ; <i>Enterococcus faecalis</i>	(NIU; LI; CHEN; TIAN <i>et al.</i> , 2011) (PAN; ZHANG; WANG; LI <i>et al.</i> , 2013)
Macrolactin G-M	Lactonas macrocíclicas	<i>Bacillus</i> sp. PP19-H3	<i>S. aureus</i> ; <i>Bacillus subtilis</i>	(FAULKNER, 2002; MONDOL; SHIN; ISLAN, 2013)
Marfomycins A, B, E	Peptídeo cíclico	<i>Streptomyces drozdowiczii</i> (SCSIO 10141)	<i>M. luteus</i>	(TORTORELLA; TEDESCO; PALMA ESPOSITO; JANUARY <i>et al.</i> , 2018)
Marfuraquinocins A, C, D	<i>Sesquiterpeno</i>	<i>Streptomyces niveus</i> (SCSIO 3406)	<i>S. aureus</i> ; MRSE	(SONG; HUANG; CHEN; DING <i>et al.</i> , 2013)
Marthiapeptide A	Peptídeo cíclico	<i>Marinactinospora thermotolerans</i> (SCSIO 00652)	<i>Micrococcus luteus</i> ; <i>S. aureus</i> ;	(ZHOU; HUANG; CHEN; TAN <i>et al.</i> , 2012)
MC21-A	Fenólico	<i>Pseudoalteromonas phenolica</i> (O-BC30)	MRSA	(HASTE; PERERA; MALONEY; TRAN <i>et al.</i> , 2010)
Micromonohalimane B	Diterpenos	<i>Micromonospora</i> sp.	MRSA	(BLUNT; CARROLL; COPP; DAVIS <i>et al.</i> , 2018); (ZHANG; ADNANI; BRAUN; ELLIS <i>et al.</i> , 2016)
Nosiheptide	Tiopeptídeo	<i>Streptomyces</i> sp (CNT-373)	MRSA resistente à vancomicina	(HASTE; THIENPHRAPA; TRAN; LOESGEN <i>et al.</i> , 2012)
PM181104	Peptídeo cíclico	<i>Actinobacterium Kocuria</i> sp (MTCC 5269) (associado a esponja marinha)	MRSA resistente à vancomicina	(LIU; EL-HOSSARY; OELSCHLAEGER; DONIA <i>et al.</i> , 2019)

Ref: Fonte de referência

MRSA: methicillin-resistant *S. aureus*.

MRSE: methicillin-resistant *S. epidermidis*

Adaptado de LIU *et al.* (2019); TORTORELLA *et al.* (2018)

1.2.2 ESPONJAS MARINHAS E BACTÉRIAS ASSOCIADAS

As esponjas marinhas são invertebrados multicelulares, filtradores, que vivem aderidos a substratos sólidos; possuem poros em sua superfície que permitem a passagem de água, partículas e microrganismos para sua nutrição. Elas pertencem ao filo Porifera, que contém 25 ordens, 128 famílias e 680 gêneros, no qual são divididos em quatro classes (Calcarea, Demospongiae, Homoscleromorpha e Hexactinellida), contendo uma grande variabilidade de espécies (BRINKMANN; MARKER; KURTBÖKE, 2017). Por serem organismos sésseis, ao longo da evolução desenvolveram estratégias químicas para defenderem-se contra competidores, predadores e patógenos, o que contribui para a produção de moléculas bioativas, incluindo policetídeos, alcalóides, macrolídeos, esteróis, peptídeos e terpenos, que apresentam atividades antitumoral, anti-inflamatório e antimicrobiano para humanos (BRINKMANN; MARKER; KURTBÖKE, 2017; THOMAS; KAVLEKAR; LOKABHARATHI, 2010). Contraditoriamente, essas esponjas marinhas atuam como um reservatório de microrganismos, que correspondem a 50-60% de sua biomassa, no qual ambos relacionam-se de forma mutualista (WEBSTER; TAYLOR, 2012).

Como vantagens dessa relação de simbiose entre esponja e microrganismos, pode-se citar o importante papel desempenhado pelas bactérias associadas à aquisição de alimentos, estabilização do esqueleto da esponja, processamento e reciclagem de resquícios metabólicos e produção de metabólitos secundários para combater predadores, enquanto a esponja propicia proteção física e também disponibiliza nutrientes para as bactérias (HENTSCHEL; HOPKE; HORN; FRIEDRICH *et al.*, 2002; KIRAN; SEKAR; RAMASAMY; THINESH *et al.*, 2018; THOMAS; KAVLEKAR; LOKABHARATHI, 2010). Nesse contexto, alguns estudos indicam que algumas moléculas bioativas isoladas de esponjas são produzidas pelos microrganismos simbióticos (PROKSCH; EDRADA; EBEL, 2002; ROMANO; COSTANTINI; SANSONE;

LAURITANO *et al.*, 2017; SACRISTÁN-SORIANO; BANAIGS; CASAMAYOR; BECERRO, 2011; ZHANG; AN; WANG; SUN *et al.*, 2005).

A população bacteriana que habita esponjas marinhas é bastante diversa, com 28 filos descritos, contudo, os filos que são constantemente identificados entre as diversas esponjas incluem: Proteobacteria, Actinobacteria, Acidobacteria, Bacteroidetes, Chloroflexi, Cyanobacteria, e Firmicutes (BRINKMANN; MARKER; KURTBÖKE, 2017). As esponjas oferecem um microambiente capaz de estimular a produção de metabólitos biotecnologicamente potentes por parte desses microrganismos, visto que as bactérias coabitam a esponja com outras bactérias, disputando pelo espaço, além de resistirem à ação compostos antimicrobianos produzidos pela própria esponja, o que estimula essa produção (SANTOS; SOARES; MACHADO; ROMANOS *et al.*, 2015; TAYLOR; RADAX; STEGER; WAGNER, 2007).

Uma grande diversidade de compostos químicos com atividade antimicrobiana produzidos especificamente por bactérias marinhas associadas as esponjas, como alcalóides, lipopeptídeos, quinolonas, proteínas e peptídeos, já foram descritos na literatura (CHEUNG; NG; WONG, 2015; SANTOS; SOARES; MACHADO; ROMANOS *et al.*, 2015). Os principais gêneros bacterianos produtores de compostos antimicrobianos estão indicados na Figura 1.

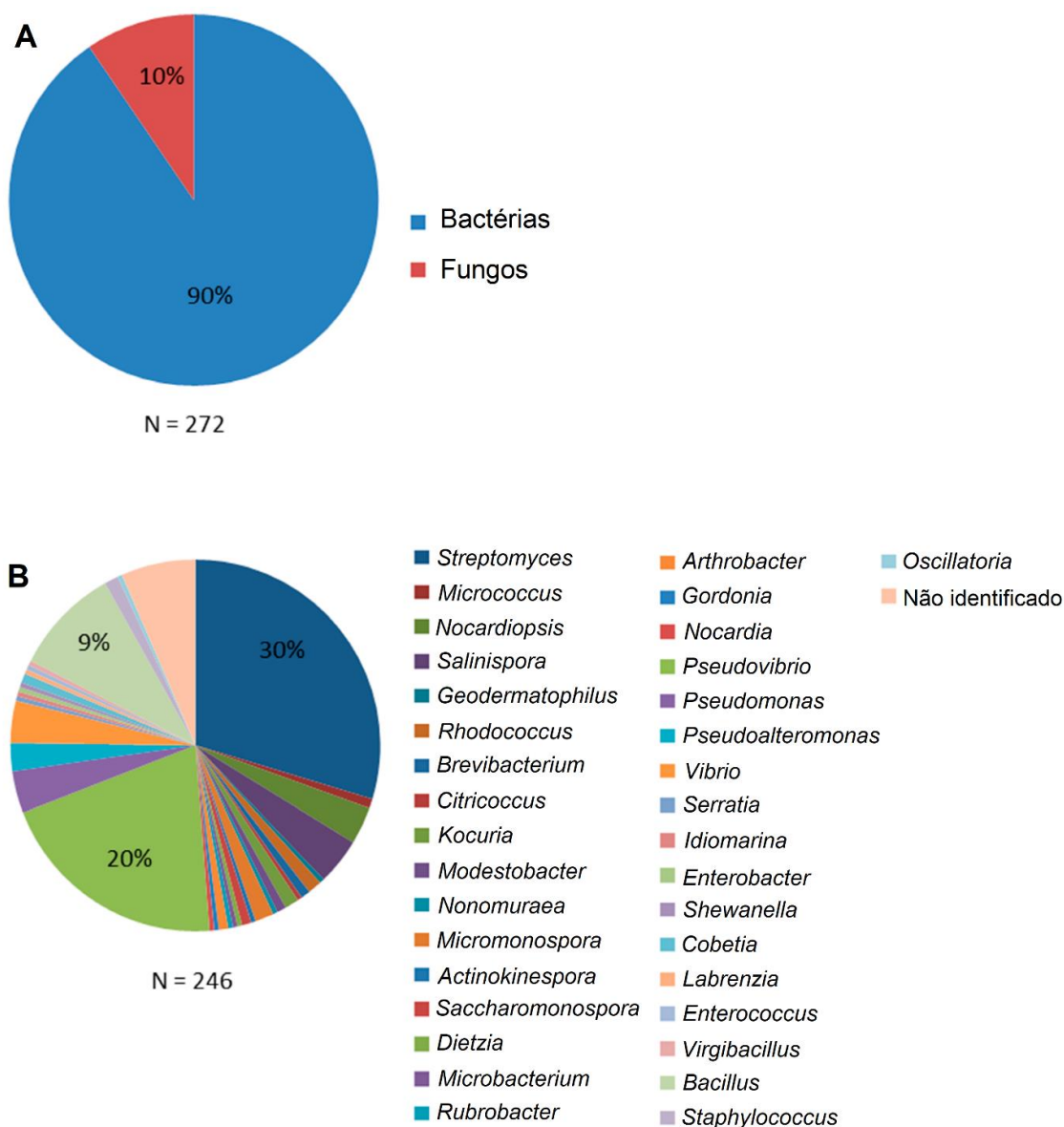


Figura 1. Compostos com atividade antimicrobiana distribuídos entre os gêneros bacterianos associados às esponjas marinhas. (A) Indica a predominância da população de bactérias (90%) nas esponjas comparado com fungos (10%) com um número amostral (n) de 272 microrganismos previamente isolados de esponjas marinhas; (B) Distribuição da porcentagem de compostos ativos entre os 35 gêneros bacterianos identificados, sendo que *Streptomyces* spp. é majoritário (30%), seguido por *Pseudovibrio* spp. (20%) e *Bacillus* spp. (9%). Os gêneros bacterianos encontrados pertencem a um dos 4 filos: Actinobacteria, (majoritariamente), Proteobacteria, Firmicutes e Cyanobacteria. Extraído de INDRANINGRAT; SMIDT; SIPKEMA (2016), conforme orientação da Editora (MDPI).

Em um estudo recente realizado com 12 esponjas marinhas coletadas no sul da Austrália, um total de 1234 colônias bacterianas foram obtidas e dessas, 169 foram fermentadas e tiveram seu extrato bruto testado para atividade antimicrobiana contra diversas bactérias, incluindo Gram-positivas, Gram-negativas e fungos patogênicos. 41% dos extratos (70

bactérias) apresentaram uma bioatividade contra pelo menos uma cepa teste, incluindo *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*), *S. aureus* resistente à meticilina (em inglês, *methicillin-resistant S. aureus* - MRSA) e fungos. A maioria das substâncias bacterianas ativas foram sintetizadas por actinomicetos (58%) (ANTENEH; YANG; BROWN; FRANCO, 2021). Além desse estudo, outros trabalhos analisando compostos produzidos por bactérias associadas às esponjas foram realizados com amostras coletadas na costa brasileira (SANTOS; PONTES; SANTOS; MURICY *et al.*, 2010), mar vermelho na Arábia Saudita (BIBI; NASEER; AZHAR, 2021), mar da Índia (RAJASABAPATHY; GHADI; MANIKANDAN; MOHANDASS *et al.*, 2020; SKARIYACHAN; CHALLAPILLI; PACKIRISAMY; SRIDHAR *et al.*, 2020), sul da China (LI; LIU; ZHU; YANG *et al.*, 2011), Turquia (ALTUĞ; ÇİFTÇİ TÜRETKEN; KALKAN; TOPALOĞLU, 2021) e Indonésia (RIYANTI; BALANSA; LIU; SHARMA *et al.*, 2020), por exemplo. Todos os estudo citados acima destacam a capacidade desses microrganismos em sintetizar extratos e/ou moléculas efetivas contra patógenos humanos.

Entre as moléculas responsáveis por ações antibióticas que já foram purificadas e identificadas, pode-se citar o pirrol (pyrrolo[1,2-a] pyrazine-1,4-dione) produzido por *Bacillus tequilensis* – isolado da esponja marinha *Callyspongia diffusa* - com atividade antimicrobiana e antioxidante contra *S. aureus*; peptídeo (kocurin, thiazolyl peptide) produzidos por actinomicetos efetivos contra MRSA; indole, ácido 3-fenilpropanoico e ácido fenilpropanóico (dimer 4,4'-oxybis[3-phenylpropionic acid), todos produzidos por *Bacillus licheniformis* e isolados da esponja *Halichondria* sp., apresentaram alguma atividade antimicrobiana contra MRSA, *Salmonella typhi*, *Candida albicans*, *Rhodotorula* sp. e/ou *Aspergillus fumigatus* (ANTENEH; YANG; BROWN; FRANCO, 2021; DEVI; WAHIDULLAH; RODRIGUES; SOUZA, 2010; KIRAN; PRIYADHARSINI; SAJAYAN; RAVINDRAN *et al.*, 2018; PALOMO; GONZÁLEZ; DE LA CRUZ; MARTÍN *et al.*, 2013).

1.3 Infecções resistentes e seu impacto na sociedade

A descoberta de novas moléculas antibióticas ou antivirulência é de extrema relevância para o combate de infecções de difícil erradicação. As infecções resistentes, causadas por bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, que evadem a ação de múltiplos agentes antimicrobianos tornaram-se um problema de saúde pública. Organismos multidrogas-resistentes (do inglês, *multidrug-resistant organisms*, MDROs) podem apresentar diferentes níveis de resistência ao considerar o número de antimicrobianos que eles toleram e/ou a sua tolerância a fármacos específicos (MAGIORAKOS; SRINIVASAN; CAREY; CARMELI *et al.*, 2012).

As infecções causadas por MDROs estão correlacionadas com um maior número de mortes comparado às infecções causadas por microrganismos sensíveis aos antibióticos - cerca de 25.000 mortes precoces por ano nos Estados Unidos da América (EUA) e na Europa, podendo chegar a 100.000 na China. Além disso, geram um significativo impacto econômico estimado em 20 bilhões de dólares por ano somente nos EUA, podendo alcançar 100 trilhões de dólares em 2050 (MUNITA; ARIAS, 2016).

Por essas razões, a Organização Mundial da Saúde (OMS) considerou a resistência antibiótica um dos três principais problemas para a saúde pública do século 21 e, no ano de 2017, desenvolveu, pela primeira vez, uma lista com bactérias antibiótico-resistentes de prioridade global para serem objetos de pesquisas científicas, visando a identificação de novas moléculas antibióticas para o tratamento efetivo dessas infecções (MUNITA; ARIAS, 2016; ORGANIZATION, 2017). A lista foi dividida em microrganismos de altíssima (crítico), alta e média prioridade (Tabela 2).

Tabela 2. Lista produzida pela Organização Mundial da Saúde (OMS) com os microrganismos prioridades para estudo contra sua resistência à antimicrobianos.

ALTÍSSIMA PRIORIDADE	ALTA PRIORIDADE	MÉDIA PRIORIDADE
<i>Acinetobacter baumannii</i> , carbapenem-resistant	<i>Campylobacter</i> , fluoroquinolone-resistant	<i>Haemophilus influenzae</i> , ampicillin-resistant
<i>Enterobacteriaceae</i> *, carbapenem-resistant, 3 rd generation cephalosporin-resistant	<i>Enterococcus faecium</i> , vancomycin-resistant	<i>Shigella spp.</i> , fluoroquinolone-resistant
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> , carbapenem-resistant	<i>Helicobacter pylori</i> , clarithromycin-resistant	<i>Streptococcus pneumoniae</i> , penicillin-non-susceptible
	<i>Salmonella spp.</i> , fluoroquinolone-resistant	
	<i>Staphylococcus aureus</i> , methicillin-resistant, vancomycin intermediate and resistant	
	<i>Neisseria gonorrhoeae</i> , 3 rd generation cephalosporin-resistant, fluoroquinolone-resistant	

Adaptado de WHO, 2017

* Enterobacteriaceae include: *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Enterobacter spp.*, *Serratia spp.*, *Proteus spp.*, and *Providencia spp*, *Morganella spp.*

Altos índices de resistência antibiótica são comumente observados em infecções nosocomiais, definidas como infecções que afetam indivíduos durante cuidados médicos, seja em hospitais ou instituições de saúde (KHAN; BAIG; MEHBOOB, 2017). Elas podem ser adquiridas a partir de fontes endógenas (do próprio paciente) e exógenas, como transferência pelo contato com outros pacientes infectados, com profissionais da área da saúde, visitantes e através de objetos contaminados. Além disso, estão geralmente associados à infecções na corrente sanguínea, do trato urinário devido à presença de cateteres contaminados, pneumonia por ventilação mecânica e sítios expostos à cirurgia (KHAN; BAIG; MEHBOOB, 2017).

Essas infecções resistentes são responsáveis por altas taxas de morbimortalidade, com altos custos de tratamento, e são comumente causadas por patógenos “ESKAPE”, isto é, um acrônimo referente a um grupo constituídos pelas seguintes bactérias: *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Enterobacter spp.* (SANTAJIT; INDRAWATTANA, 2016). O grupo ESKAPE é caracterizado por um elevado grau de resistência antimicrobiana ao redor de todo o mundo e são responsáveis por afetar gravemente indivíduos imunocomprometidos

(NICOLAS; BORDEAU; BONDON; BAUDY-FLOC'H *et al.*, 2019; SANTAJOIT; INDRAWATTANA, 2016).

Estima-se que cerca de 10 milhões de pessoas morrerão por ano no mundo devido às infecções persistentes nos anos próximos à 2050 (O'NEILL, 2014) e, nesse contexto, *Staphylococcus aureus* metilina-resistente destaca-se por já ter causado um número de mortes comparável à infecção do vírus da imunodeficiência humana (em inglês, *human immunodeficiency virus* – HIV) (DE KRAKER; STEWARDSON; HARBARTH, 2016; NICOLAS; BORDEAU; BONDON; BAUDY-FLOC'H *et al.*, 2019).

Apesar do Centro de Controle e Prevenção de Doenças (em inglês, *Centers for Disease Control and Prevention* - CDC) dos EUA ter indicado, através de relatórios, que o número de infecções por MRSA declinaram entre 2013 e 2017, por muito tempo esses microrganismos foram indicados como causadores de 19.000 mortes e 360.000 hospitalizações todos os anos nos EUA, levando à gastos que chegaram a 4 milhões de dólares para o setor de saúde (CDC, 2019; MARTENS; DEMAIN, 2017). Apesar dessa queda no número de infecções ter sido gerada pela implementação de recomendações de intervenção do CDC em locais de saúde - que incluem avaliar o paciente para risco de infecção por MRSA na sua admissão hospitalar, rastrear os casos, prover Equipamentos de Proteção Individual (EPIs) como luvas para indivíduos com MRSA e estimular higiene das mãos -, o progresso de redução das infecções MRSA na corrente sanguínea está lento (CDC, 2019).

Como citado anteriormente, o impacto econômico e social causado por essas mortes infecciosas tornou-se um problema de saúde pública enorme ao redor de todo o mundo. Seguindo o mesmo padrão que os EUA, na Europa mais de 2,5 milhões de indivíduos contraem infecções nosocomiais todos os anos com altas porcentagens de resistência e mortalidade (25,000 mortes/ano) (DE MOL; SNOECK; DE MAESENEIRE; SOETAERT, 2018). Apesar desses números, o investimento em produção de antibióticos por parte de grandes companhias

farmacêuticas diminuiu ao longo dos anos devido às dificuldades enfrentadas nesse mercado, como a resistência bacteriana, produção de remédios genéricos, a dificuldade de identificar novas moléculas naturais e os altos custos de tempo e dinheiro para lançar um novo medicamento no mercado farmacêutico (DE MOL; SNOECK; DE MAESENEIRE; SOETAERT, 2018; MARTENS; DEMAÏN, 2017).

Entretanto, incentivos governamentais em diversos países (EUA e países europeus, especialmente) foram criados para estimular o interesse empresarial na descoberta de novas moléculas antibióticas e no combate às infecções resistentes através da utilização de novas tecnologias, como sequenciamento genético nas pesquisas, e através do incentivo financeiro para companhias farmacêuticas menores e indústrias de biotecnologia. Esses programas de incentivo voltados à pesquisa científica visam também acelerar a inovação antimicrobiana, o que tem mostrado um impacto positivo, apesar de que um incentivo à longo prazo ainda se fazer necessário para o cumprimento de todas as etapas de desenvolvimento de um novo antibiótico, desde a sua pesquisa básica até sua chegada ao mercado farmacêutico (MARTENS; DEMAÏN, 2017; SIMPKIN; RENWICK; KELLY; MOSSIALOS, 2017).

1.4 Antibióticos e seus mecanismos de ação

Há indícios que o uso de antimicrobianos produzidos por microrganismos para prevenir o desenvolvimento de doenças é realizado há mais de 2000 anos, como o uso de pão mofado para tratar feridas na época dos egípcios e gregos, além da utilização do extrato de plantas (HUTCHINGS; TRUMAN; WILKINSON, 2019). Contudo, ao longo dos últimos 100 anos, cientistas foram descobrindo moléculas ativas capazes de combater diversas bactérias e evitar doenças, sendo que a descoberta acidental da penicilina por Alexander Fleming em 1928 foi um marco para a ciência. A partir disso, os microrganismos passaram a ser alvos importantes

lactâmicos - incluindo penicilinas, cefalosporinas, monobactams e carbapenêmicos- e glicopeptídeos – vancomicina e teicoplanina; (2) inibir a síntese de proteínas através da ligação às subunidades ribossomais (30s ou 50s), como os macrolídeos, aminoglicosídeos, tetraciclina, cloranfenicol, estreptograminas e oxazolidinonas; (3) interferir na síntese de ácidos nucleicos através da lise da dupla-fita de DNA durante a replicação celular - no qual fazem parte os fluoroquinolonas- ou do RNA – rifampicina; (4) inibir alguma via de metabolização como a interrupção da síntese do folato (ácido fólico ou vitamina B9), importante para os processos de reparação e síntese de DNA, pela ação de sulfonamidas e trimetopima; (5) Ruptura da membrana celular através do aumento da sua permeabilidade e consequentemente despolarização, ação desenvolvida por polimixinas e lipopeptídeos (KAPOOR; SAIGAL; ELONGAVAN, 2017; TENOVER, 2006; DERSCH; STADLER, 2016; KAPOOR; SAIGAL; ELONGAVAN, 2017; NGUYEN; STAROSTA; ARENZ; SOHMEN *et al.*, 2014; WILSON, 2014; HIGGINS; FLUIT; SCHMITZ, 2003; KAPOOR; SAIGAL; ELONGAVAN, 2017; HIGGINS; FLUIT; SCHMITZ, 2003; KAPOOR; SAIGAL; ELONGAVAN, 2017; YIN; MENG; CHENG; FU *et al.*, 2020).

1.5 Resistência bacteriana aos antibióticos

As vantagens da introdução de antibióticos no tratamento de infecções são inquestionáveis, tanto por salvar vidas como por permitir o desenvolvimento da medicina moderna; todavia, ao longo do tempo, as bactérias foram desenvolvendo sofisticados mecanismos de resistência para sobreviver à ação desses compostos (Tabela 3), resultando em uma crise mundial de resistência antimicrobiana (LEWIS, 2020; MUNITA; ARIAS, 2016).

Tabela 3. Mecanismo de resistência das principais classes de antibióticos

Antibiótico	Mecanismo de ação	Resistência bacteriana	Microrganismos resistentes
Aminoglicosídeo	Afetam síntese de proteínas por ligarem-se à subunidade 30S	Reduzem captação do composto (alteração de compostos de membrana) e modificam enzimas (AGEs)	Gram-negativas
Beta-lactâmicos	Interrompem síntese da parede celular (peptideoglicanos)	Produção de enzimas betalactamases e alteram proteínas PBP	<i>S. aureus</i> , <i>S. pneumoniae</i> , Gram-negativas
Cloranfenicol	Interferem na síntese de proteínas por ligarem no centro de transferência peptidil na subunidade 50S	Inativam quimicamente o antibiótico pela expressão de Cloranfenicol acetiltransferases e aumentam a produção de bombas de efluxo	<i>E. coli</i>
Glicopeptídeos	Interrompem síntese da parede celular (peptideoglicanos)	Alteram alvo: D-alanil-alanina é alterado para D-alanil-D-lactato e diminuem a permeabilidade do fármaco	Vancomicina resistentes, especialmente <i>E. faecium</i>
Macrolídeos	Inibem síntese proteica por ligarem-se na subunidade 50S	Metilação do ribossomo e bomba de efluxo.	Gene erm em <i>S. aureus</i> , <i>S. pneumoniae</i> e <i>S. pyogenes</i>
Oxazolidinonas	Afetam a síntese de proteínas por interagirem com sítio A do ribossomo	Mutação em gene que reduz ligação ao sítio ativo ou metilação de aminoácido	<i>E. faecium</i> e <i>S. aureus</i>
Quinolonas	Inibem DNA girase	Alteração de gene-alvo por mutação (redução da afinidade) e bomba de efluxo	Bactérias entéricas Gram-negativas, <i>S. aureus</i> e <i>S. pneumoniae</i>
Sulfonaminas	Inibe o metabolismo de ácido fólico	Mutação em gene alterando o alvo e/ou bomba de efluxo	<i>E. coli</i> , <i>S. aureus</i> e <i>S. pneumoniae</i>
Teraciclínas	Inibem síntese proteica ligando-se na subunidade 30S	Bomba de efluxo e/ou síntese de proteínas que se ligam nos ribossomos e alteram a conformação do sítio ativo	Gram-positivas e Gram-negativas
Lipopeptídeos/peptídeos caiônicos (CAMPs)	Altera a homeostase do envelope celular (destruição da membrana)	Alteração de sistemas reguladores do envelope celular e moléculas-alvo	<i>E. faecalis</i> , <i>B. subtilis</i>

AGEs: aminoglycoside modifying enzymes
 PBP: penicillin binding protein

Adaptado de Kapoor, 2017

A resistência bacteriana pode ser intrínseca à alguns antibióticos ou adquirida de diferentes formas, como através de mutações em genes cromossomais ou pela transferência horizontal de genes por conjugação ou plasmídeos (BLAIR; WEBBER; BAYLAY; OGBOLU

et al., 2015). Dentre esses mecanismos bacterianos, desenvolvidos pela pressão seletiva que favorece a resistência e a disseminação de cepas resistentes, encontram-se a restrição de penetração antibiótica, bombas de efluxo, modificação de estrutura alvo, modificação ou alteração da molécula antibiótica, mudança de alvo ou sequestro do alvo (BLAIR; WEBBER; BAYLAY; OGBOLU *et al.*, 2015; LERMINIAUX; CAMERON, 2019; LEWIS, 2020).

A resistência intrínseca refere-se à habilidade de resistir à ação de uma molécula antibiótica por características estruturais ou funcionais, como as diferenças constitucionais entre bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (BLAIR; WEBBER; BAYLAY; OGBOLU *et al.*, 2015). Por exemplo, a membrana citoplasmática de Gram-positivas é constituída por mais fosfolipídeos carregados negativamente (aniônicos), importante para ação de fármacos como o lipopeptídeo daptomicina, que através de íons Ca^{2+} interagem com esses fosfolipídeos aniônicos, levando à despolarização celular, o que não ocorre em Gram-negativas, sendo pouco efetivo contra eles (RANDALL; MARINER; CHOPRA; O'NEILL, 2013).

As mutações cromossômicas que estimulam a resistência ocorrem geralmente em genes que são alvo terapêutico (como genes que codificam topoisomerasas, alvo de quinolonas), genes que codificam transportadores (como inibição do OprD2, transportador de imipenem em *P. aeruginosa*, reduzindo a entrada do antibiótico) e genes reguladores da expressão de transportadores ou de enzimas modificadoras de antibióticos e bombas de efluxo. Por exemplo, uma mutação no gene regulador MarA pode estimular a expressão de genes codificantes para bombas de efluxo, responsáveis por expulsar o fármaco do interior da célula (MARTINEZ, 2014). Também podem ocorrer modificações nas subunidades ribossomais (30S e 50S), nas enzimas PBP (estratégia utilizada especialmente pelas Gram-positivas), em precursores da parede celular, mutação na DNA-girase e RNA polimerase (KAPOOR; SAIGAL; ELONGAVAN, 2017). De forma resumida, essas alterações modificam a ação de antibióticos por diminuir a afinidade do fármaco pela molécula alvo ou diminuir a capacidade de entrada

na célula, aumentar mecanismo de efluxo ou alterar vias metabólicas por modulação de reguladores (MUNITA; ARIAS, 2016).

A transferência horizontal de genes (em inglês, *horizontal gene transfer*, HGT) permite às bactérias adquirirem características genéticas externas à sua linhagem clonal, especialmente referentes à resistência antibiótica (em inglês, *antibiotic resistance genes*, ARG), além de genes de virulência e habilidade de formar biofilme, através de plasmídeos, bacteriófagos e DNA extracelular via conjugação, transdução e transformação natural, respectivamente (LERMINIAUX; CAMERON, 2019). Muitos desses processos são estimulados pelo uso de doses não inibitórias (sub-doses) de antibióticos, que acabam atuando como um sinalizador que modula a transcrição de genes de virulência, transferência de material genético, aumenta taxa de recombinação e mutação (ANDERSSON; HUGHES, 2014).

1.6 Fatores de virulência bacteriana

A patogenicidade é definida como a habilidade de um agente microbiano em causar doença através, especialmente, de sua toxicidade – produção de substância capaz de danificar as células hospedeiras – e da capacidade de invasão, isto é, potencial de penetrar e se disseminar no corpo do hospedeiro (BECEIRO; TOMÁS; BOU, 2013). A competência do microrganismo em sobreviver e multiplicar no tecido também é considerado um determinante para causar uma patologia (CASADEVALL; PIROFSKI, 2009). Contudo, o desenvolvimento da doença é resultado de interações complexas entre patógeno-hospedeiro, dependente do estado imunológico do indivíduo, que varia de acordo com hábitos alimentares, comportamentais e questões genéticas, sendo multifatorial. Isso determina a susceptibilidade do indivíduo frente à infecção (BECEIRO; TOMÁS; BOU, 2013; DE SOUZA, 2003).

Durante essa interação, bactérias patogênicas utilizam diversos mecanismos para colonizar o corpo invadido. Esses mecanismos são denominados fatores de virulência,

definidos como moléculas produzidas e secretadas por microrganismos, incluindo enzimas, toxinas, exopolissacarídeos, estruturas de parede celular, lipopolissacarídeos, glicoproteínas e lipoproteínas, que auxiliam, então, na adesão, invasão, escape da resposta imune e sobrevivência dos patógenos (LEITÃO, 2020; NIU; YU; WANG; REN *et al.*, 2013).

Dentre as estratégias desenvolvidas pelas bactérias para sobreviver, encontram-se os próprios constituintes das estruturas bacterianas, como flagelo e adesinas (fímbria ou adesinas afimbriais) - estruturas importantes para o deslocamento do organismo e para interação/adesão ao tecido hospedeiro, respectivamente. Além disso, bactérias Gram-positivas naturalmente produzem uma cápsula espessa para escapar da fagocitose de células do sistema imune, enquanto Gram-negativas possuem lipopolissacarídeos (LPS), uma endotoxina constituinte da parede bacteriana, que auxilia na integridade estrutural (NIU; YU; WANG; REN *et al.*, 2013). A habilidade das bactérias em colonizar um hospedeiro também se deve à presença de fatores como invasinas - que como o próprio nome diz, promovem a invasão das células hospedeiras - , enzimas especializadas e toxinas que auxiliam na evasão do sistema imune, na sua movimentação, acesso aos nutrientes e no sequestro de metais como ferro e magnésio (exemplo: ferro via sideróforos) importantes para o metabolismo celular (CASADEVALL; PIROFSKI, 2009; DE SOUZA, 2003; NIU; YU; WANG; REN *et al.*, 2013).

Dentre os fatores de virulência das bactérias, a presença de biofilme foi correlacionada com 80% das infecções microbianas de difícil tratamento (MÜHLEN; DERSCH, 2016). A formação desse biofilme, que desenvolve um importante papel na tolerância à antibióticos e à ação do sistema imune do hospedeiro, é dependente inicialmente das moléculas adesinas - para que ocorra a adesão inicial às superfícies - e posteriormente do *quorum sensing* (QS) para a comunicação bacteriana e coordenação das respostas gênicas às mudanças e estresses ambientais (MÜHLEN; DERSCH, 2016; STONES; KRACHLER, 2015).

1.6.1 ADESINAS

Microrganismos produzem uma variedade de proteínas de superfície, chamadas adesinas, importantes para sua adesão às células hospedeiras e à superfícies inanimadas como biomateriais (VIELA; MATHELIÉ-GUINLET; VILJOEN; DUFRÊNE, 2020). As adesinas são proteínas (classificadas em fibrilares, pilus e afibrilares) ou glicanos, no qual possuem uma seletividade por moléculas alvo da membrana celular hospedeira, reconhecendo regiões ou estruturas específicas nessas superfícies, o que favorece a interação e patogenicidade bacteriana. Dentre as proteínas bacterianas conhecidas, encontram-se as fímbrias e os pilus, além de proteínas não poliméricas, que contribuem para esse reconhecimento da matriz extracelular do hospedeiro como colágeno, proteoglicanos, lamininas, ácido hialurônico e elastinas. Além disso, moléculas de adesão da própria célula hospedeira, incluindo caderinas integrinas e selectinas, também possuem afinidade de ligação com estruturas de superfície dos microrganismos (SOLANKI; TIWARI; TIWARI, 2018).

1.6.2 BIOFILME

Bactérias e fungos podem existir de 2 formas: na forma planctônica ou como biofilme (BLACKMAN; QU; CASS; LOCOCK, 2021). Biofilmes são definidos como comunidades de microrganismos recobertos por uma matriz extracelular de substâncias poliméricas produzida pelos próprios micróbios ali presentes, podendo ser desenvolvido sobre superfícies bióticas ou abióticas e na interface líquido-sólido ou líquido-ar (FLEMMING; WUERTZ, 2019; SCHULZE; MITTERER; POMBO; SCHILD, 2021). Essas estruturas são muito relevantes em doenças humanas já que sua formação está associada à cronicidade de diversas infecções, especialmente as causadas por bactérias patogênicas, como quadros de colite, vaginite, conjuntivite, uterite, otite, entre outros. Sua formação é observada tanto em dispositivos médicos - lentes de contato, cateteres, próteses e válvulas cardíacas- quanto em superfícies

corporais, como pele e mucosas do trato digestivo e respiratório (DAVIES, 2003; SCHULZE; MITTERER; POMBO; SCHILD, 2021).

A formação do biofilme é complexa e dividida em etapas (Figura 3), sendo elas: (1) adesão às superfícies bióticas ou abióticas, (2) formação de microcolônias e maturação do biofilme, no qual há comunicação bacteriana (chamada de *quorum sensing*, QS), e (3) dispersão (JAMAL; AHMAD; ANDLEEB; JALIL *et al.*, 2018; ROY; TIWARI; DONELLI; TIWARI, 2018; TOLKER-NIELSEN, 2015). A adesão bacteriana à uma superfície, iniciada como uma estratégia de proteção devido a alterações nas condições ambientais, ocorre através de ligações não-específicas - ligações de Van der Waals, ácido-base, hidrofóbicas e forças de interação eletrostáticas - com proteínas presentes no meio ou com outras espécies microbianas presentes no local. Posteriormente, o acúmulo de bactérias na região é geralmente mediado por sedimentação, forças hidrodinâmicas e movimento browniano, apesar de que quimotaxia ativa e movimentos direcionados por flagelo também podem ocorrer (BLACKMAN; QU; CASS; LOCOCK, 2021; PALMER; FLINT; BROOKS, 2007; ROY; TIWARI; DONELLI; TIWARI, 2018).

2 Biofilme bacteriano

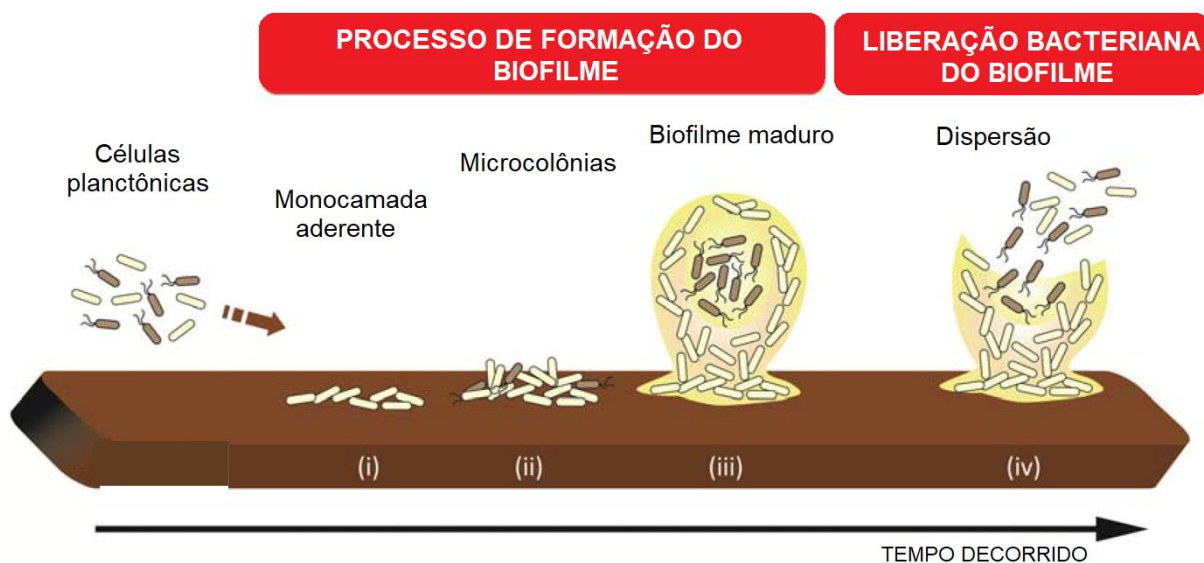


Figura 3. Descrição das etapas de formação do biofilme bacteriano. (i) Células planctônicas interagindo com a superfície biótica ou abiótica; (ii) desenvolvimento de microcolônias primeira etapa da maturação; (iii) biofilme maduro na forma sésil; (iv) dispersão do biofilme maduro. Adaptado de SILVA; ZIMMER; MACEDO; TRENTIN (2016), conforme orientação da Editora (AMERICAN CHEMICAL SOCIETY).

Essa adesão de células individuais pode ser dividida em duas fases: (1) adesão inicial reversível e (2) adesão irreversível. A primeira ocorre devido às ligações hidrofóbicas e eletrostáticas reversíveis, que podem ser desfeitas por forças dos fluidos, enquanto a segunda é caracterizada pela formação de ligações de hidrogênio e covalentes irreversíveis, marcado pelo início da produção de exopolissacarídeos e pela participação de fímbrias ou pili (adesinas), promovendo uma adesão mais forte à superfície. Essa ligação torna-se difícil de romper, sendo necessário forças químicas ou físicas para desprender as bactérias da superfície (BLACKMAN; QU; CASS; LOCOCK, 2021; PALMER; FLINT; BROOKS, 2007).

Após a adesão, dá-se início ao processo de formação de microcolônias, no qual ocorre uma grande proliferação celular e produção de matriz exopolimérica (do inglês, *extracellular polymeric substances*, EPS), constituída de proteínas, lipídeos, polissacarídeos e DNA

extracelular (eDNA) (MISHRA; PANDA; DE MANDAL; SHAKEEL *et al.*, 2020). Nessa fase, há uma intensa comunicação entre as bactérias através da liberação de moléculas químicas (chamadas autoindutores), para que haja um controle da densidade populacional e coordenação do comportamento da comunidade pelo controle da expressão gênica comunitária, sendo essa a forma de comunicação bacteriana (QS) (MACEDO; ABRAHAM, 2009). Essa coordenação das ações é muito importante para que ocorra a fixação no local, distribuição e excreção de metabólitos, divisão de tarefas, além de propiciar a associação de bactérias metabolicamente distintas, visando a criação de um ambiente favorável energeticamente para todas as populações de bactérias que constituem o biofilme (JAMAL; AHMAD; ANDLEEB; JALIL *et al.*, 2018).

O biofilme maduro, caracterizado pelo aumento da quantidade de EPS produzida, originando uma estrutura no formato tridimensional “tipo cogumelo” ou “tipo torre/pilar”, altamente hidratada (98% de água), constituído por multicamadas heterogêneas nas quais há a presença de canais de água que permitem o transporte de nutrientes e oxigênio para as células; permitem também a excreção de resquícios metabólicos, atuando, assim, como um “sistema circulatório” ao longo do biofilme (BLACKMAN; QU; CASS; LOCOCK, 2021; DONLAN, 2001a; JAMAL; AHMAD; ANDLEEB; JALIL *et al.*, 2018; RUMBAUGH; SAUER, 2020). Por fim, ocorre a etapa final de desenvolvimento do biofilme: a dispersão. Nesse momento, parte das bactérias que constituem o biofilme se desprendem e assumem sua forma planctônica novamente, possibilitando a colonização de outros sítios (RABIN; ZHENG; OPOKU-TEMENG; DU *et al.*, 2015; RUMBAUGH; SAUER, 2020).

As vantagens para os microrganismos em formar biofilme são diversas, incluindo: colonizar nichos competitivos; sobreviver à ambientes estressantes causados pela privação de nutrientes, desidratação, mudanças de pH e bacteriófagos, por exemplo; proteção contra ação de células do sistema imune e agentes antimicrobianos devido à baixa taxa de crescimento bacteriano induzido pela pouca disponibilidade de nutrientes no interior da estrutura, ao

metabolismo reduzido, à presença de células dormentes ou persistentes (em inglês, chamadas de “*persistent cells*”) e inativação ou redução da penetração dos antibióticos pela presença da matriz exopolimérica, que atua também como uma barreira física (Figura 4) (DAVIES, 2003; DONLAN, 2001a; RUMBAUGH; SAUER, 2020).

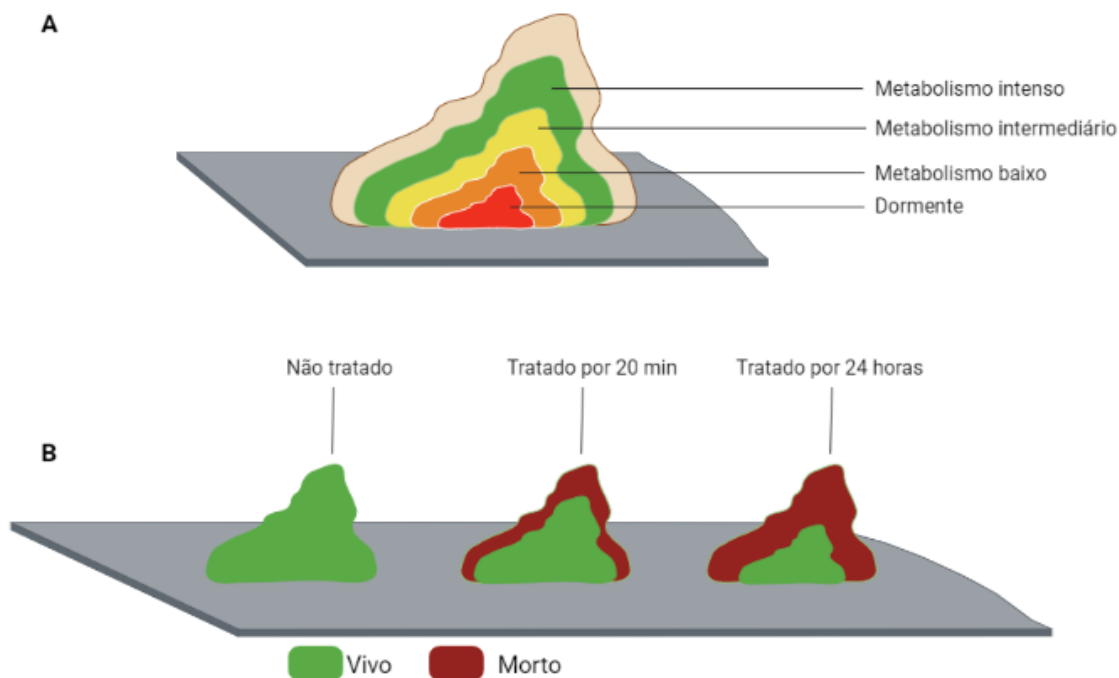


Figura 4. Organização e proteção proporcionadas pelo biofilme. (A) As bactérias, no interior do biofilme, são organizadas por diferentes níveis metabólicos, o que se relaciona com as diferentes funções bacterianas e facilidade de acesso aos nutrientes, interferindo também na efetividade da ação de antibióticos que atuam sobre bactérias metabolicamente ativas; (B) Tratamentos com antibióticos sobre o biofilme geralmente resultam em morte incompleta das bactérias colonizadoras, permitindo que elas sobrevivam e se disseminem novamente pelo hospedeiro. Ilustração criada com BioRender.com.

Resumidamente, o biofilme promove a cronicidade das infecções através de características gerais compartilhadas entre todos os biofilmes: (1) A matriz EPS funciona como uma “capa protetora”, que reduz a penetração de agentes antimicrobianos e de células fagocíticas do sistema imune (impedindo a fagocitose) no interior da estrutura, além de conter compostos inativadores de agentes antimicrobianos, como polissacarídeos carregados e eDNA, que capturam alguns antibióticos; (2) a quantidade e proximidade celular estimulam a transferência horizontal de genes, especialmente genes de resistência antibiótica através de plasmídeos; (3) alteração do metabolismo bacteriano no interior do biofilme, com a presença

de células com baixa taxa metabólica o que, de forma geral, inviabiliza a ação de antibióticos que atuam sobre células em divisão celular ou crescimento. Destaca-se, nesse contexto, as células persistentes, que possuem um metabolismo quase zero, permitindo que sobrevivam aos antimicrobianos e colonizem novamente o hospedeiro após o fim do tratamento; (4) presença de bombas de efluxo, que expulsam as moléculas do interior do biofilme, atuando de forma similar com as bombas presentes em células planctônicas (RABIN; ZHENG; OPOKU-TEMENG; DU *et al.*, 2015); (DAVIES, 2003); (SCHULZE; MITTERER; POMBO; SCHILD, 2021).

1.6.2.1 *QUORUM SENSING*

Todas essas etapas de formação, maturação, dispersão e coordenação no biofilme ocorrem através da comunicação entre células chamado *quorum sensing* (QS), como citado previamente (BLACKMAN; QU; CASS; LOCOCK, 2021). QS é um mecanismo de regulação da expressão gênica que varia de acordo com a densidade populacional e com alterações ambientais, objetivando coordenar o comportamento populacional. Esse sistema é controlado através da secreção de autoindutores (AIs) ou moléculas QS, hábeis para regular fatores de virulência, esporulação, motilidade, resistência bacteriana, formação e dispersão de biofilme (BLACKMAN; QU; CASS; LOCOCK, 2021; MACEDO; ABRAHAM, 2009; RABIN; ZHENG; OPOKU-TEMENG; DU *et al.*, 2015; ZHANG; LI, 2015).

À medida que a densidade populacional no interior do biofilme cresce, um maior número de autoindutores são produzidos até atingir uma concentração limiar, permitindo sua ligação com seus receptores localizados na membrana celular bacteriana, o que leva à indução ou repressão da expressão de genes alvo (Figura 5) (RABIN; ZHENG; OPOKU-TEMENG; DU *et al.*, 2015). Exemplos de autoindutores produzidos por bactérias são as lactonas N-acil-homoserina (AHLs) e oligopeptídeos em Gram-negativas e Gram-positivas, respectivamente.

Ainda há indutores de “linguagem universal” como o autoindutor 2 (AI-2), utilizado para realizar a comunicação intra e interespecíes (BLACKMAN; QU; CASS; LOCOCK, 2021; MACEDO; ABRAHAM, 2009; RABIN; ZHENG; OPOKU-TEMENG; DU *et al.*, 2015; ZHANG; LI, 2015).

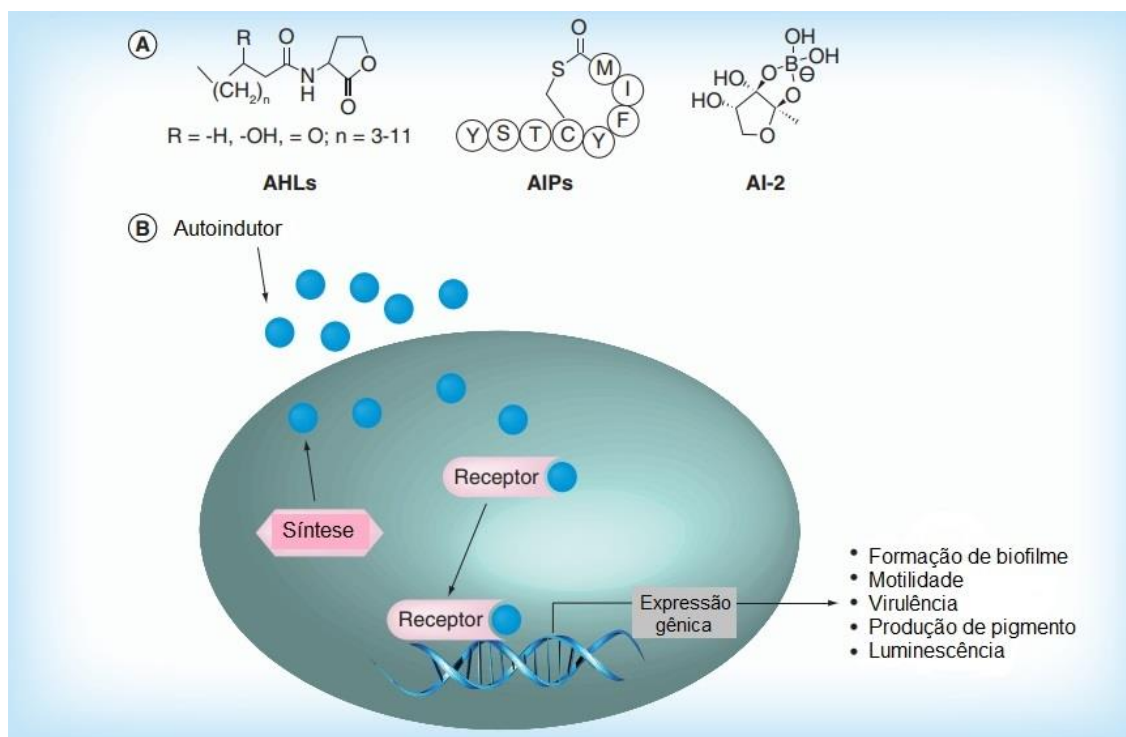


Figura 5. Sinalização do *quorum sensing* (QS). (A) Principais moléculas indutoras; (B) Mecanismos de ação do QS sobre as bactérias e as possíveis consequências adaptativas produzidas. AHLs = lactonas N-ácil-homoserina. AIPs = peptídeos autoindutores. AI-2 = o autoindutor 2. Adaptado de RABIN; ZHENG; OPOKU-TEMENG; DU *et al.*, (2015) com permissão da Future Science Group.

1.7 *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus é uma bactéria Gram-positiva, sem mobilidade, coagulase-positiva e pertencente ao filo Firmicutes (LEE; DE LENCASTRE; GARAU; KLUYTMANS *et al.*, 2018). Essa bactéria pode fazer parte da microbiota humana, vivendo de forma comensal em mucosas nasais de 20-40% da população geral, além de ser encontrado na pele e períneo de animais e humanos (LEE; DE LENCASTRE; GARAU; KLUYTMANS *et al.*, 2018; SANTAJIT; INDRAWATTANA, 2016). Apesar de um grande número de indivíduos serem carregadores desse microrganismo, *S. aureus* é uma patógeno oportunista que pode causar

diversas infecções e doenças nos humanos como infecções de pele, endocardite, pneumonia, síndrome do choque séptico e septicemia, sendo transmitido de pessoa para pessoa, especialmente através de contato direto ou partículas presentes no ambiente (SANTAJIT; INDRAWATTANA, 2016; WU; LIU; ZHU; SHEN, 2019). Geralmente essas doenças são causadas pelas bactérias em sua forma planctônica através da produção e liberação de toxinas e enzimas; entretanto, infecções resistentes comumente associam-se com a presença de biofilme, no qual permite que *S. aureus* se conectem e persistam no tecido do hospedeiro ou em dispositivos médicos, como ossos (causando osteomielite) e cateteres, respectivamente (LISTER; HORSWILL, 2014).

1.7.1 FATORES DE VIRULÊNCIA DE *Staphylococcus aureus*

Os motivos que permitem o sucesso de *S. aureus* como patógeno, possibilitando a eles colonizar e sobreviver em um hospedeiro, são as expressões de diversos fatores que contribuem para a sua virulência (Figura 6) (BUCHAN; FOSTER; RENSHAW, 2019). Para estabelecer a infecção, inicialmente essa bactéria adere-se à célula hospedeira através de proteínas de superfície chamadas MSCRAMMs, que ligam-se em moléculas de superfície celular, permitindo a entrada da bactéria no organismo (GORDON; LOWY, 2008). Além disso, estudos já especularam o papel dessas proteínas na patogenicidade de infecções associada à implantes por promoverem colonização, invasão e formação de biofilme (FOSTER; KOK; FLORES; MINARD *et al.*, 2020; JOSSE; LAURENT; DIOT, 2017). Mais de 20 MSCRAMMs já foram descritas para *S. aureus*, sendo que as principais proteínas estão relatadas na Tabela 4.

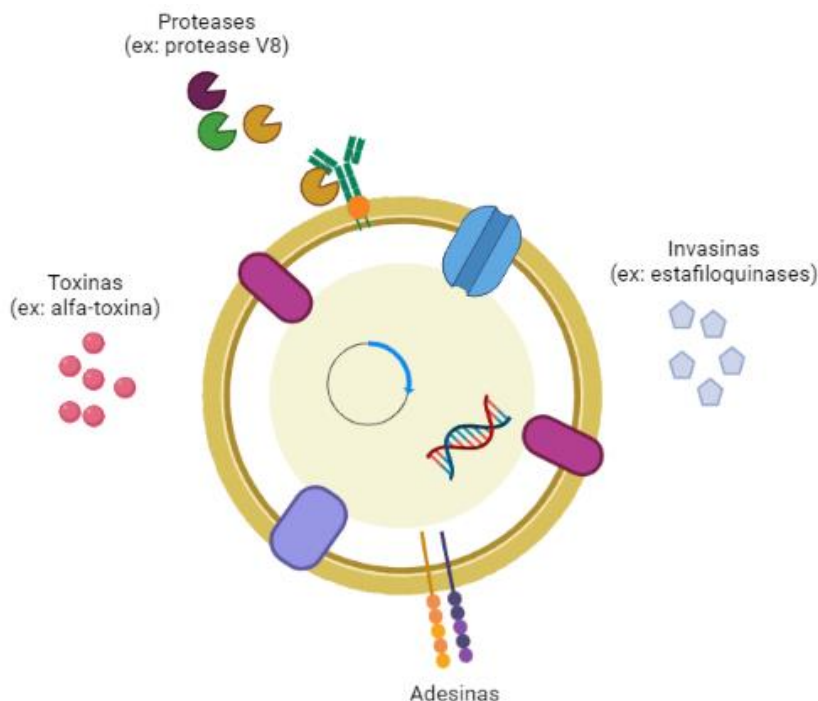


Figura 6. Principais fatores de virulência de *S. aureus*. Produção de enzimas como proteases que podem clivar anticorpos e impedir a opsonização e auxiliar a invasão ao tecido hospedeiro; proteínas como proteína A que impedem a ligação de anticorpos na célula bacteriana, além de invasinas (proteases, lipases) que auxiliam a proteção contra ações do sistema imune e invasão da célula hospedeira; toxinas são capazes de matar células do sistema imune e outras células hospedeiras (citotoxinas, superantígenos); adesinas são proteínas que se ligam em receptores de superfície das células do hospedeiro, auxiliando a invasão, além de inibir resposta do sistema complemento. Por fim, a aquisição de plasmídeos é uma forma de favorecer a sobrevivência de *S. aureus* por carregar genes de resistência à ação de antibióticos, especialmente. Ilustração criada com BioRender.com.

Tabela 4. Principais proteínas MSCRAMMs de *S. aureus*.

MSCRAMMs	Função	Ligante
<i>Autolysin (Atl)</i>	Medeia a internalização na célula hospedeira	Proteína de choque térmico Hsc70
<i>Sialo-binding protein (Bbp)</i>	Adesão ao fibrinogênio imóvel	Cadeia α do fibrinogênio
<i>Biofilm-associated protein (Bap)</i>	Adesão às superfícies inertes e celulares; cronicidade de infecções.	Chaperona Hsp90
<i>Clumping factor A (ClfA)</i>	Adesão ao fibrinogênio, evasão do sistema imune, degradação do C3b	Interação com fibrinogênio e sistema complemento
<i>Clumping factor B (ClfB)</i>	Adesão às células epiteliais descamadas e colonização nasal	Interação com fibrinogênio
<i>Collagen adhesin (Cna)</i>	Adesão em tecidos ricos em colágeno e previne ativação da via clássica do sistema complemento	Tripla hélice de colágeno, proteína C1q do sistema complemento e laminina.
<i>Fibronectin-binding proteins A (FnBPA) e B (FnBPB)</i>	Adesão na matriz extracelular - Interage com integrina e Hsp60	Ligam-se à fibronectina, fibrinogênio e elastina
<i>Serine aspartate repeat-containing protein C (SdrC), D (SdrD), E (SdrE)</i>	Ligam proteínas de superfície como desmogleína de células específicas	Adesão às células epiteliais descamadas, evasão do sistema imune e degradação de C3b

Adaptado de (FOSTER, 2019)

Dentre as estratégias utilizadas por essa bactéria - após sua invasão - para escapar das células do sistema imune estão ações de inibição sobre: (1) diapedese, ativação, quimiotaxia e ação de neutrófilos; (2) fagocitose via agregação celular, moléculas de superfície e biofilme, (3) opsonização e (4) defesas oxidativas. Ademais, produzem e liberam toxinas que eliminam células da imunidade inata (BUCHAN; FOSTER; RENSHAW, 2019; CHEUNG; BAE; OTTO, 2021).

A neutralização da ação de neutrófilos está muito correlacionada com a produção de proteínas da família SSL5 (em inglês, *superantigen-like protein 5*) e SelX, que se ligam ao PSGL-1 (do inglês, *P-selectin glycoprotein ligand-1*) presente nos leucócitos, impedindo sua ligação com P-selectinas das células endoteliais, evitando, assim, a diapedese (BESTEBROER; POPPELIER; ULFMAN; LENTING *et al.*, 2007; KOYMANS; BISSCHOP; VUGHS; VAN KESSEL *et al.*, 2016; TUFFS; JAMES; BESTEBROER; RICHARDS *et al.*, 2017).

As proteínas da família SSL também podem ligar-se, por exemplo, aos TLRs (do inglês, *toll-like receptors*), receptores presentes em leucócitos responsáveis por reconhecerem os PAMPs (padrões moleculares associados à patógenos, do inglês *pathogen-associated molecular pattern*) dos microrganismos, evitando a quimiotaxia, assim como proteínas CHIPS (do inglês, *chemotaxis-inhibitory protein of Staphylococcus*) (BARDOEL; VOS; BOUMAN; AERTS *et al.*, 2012; CHEUNG; BAE; OTTO, 2021; KOYMANS; BISSCHOP; VUGHS; VAN KESSEL *et al.*, 2016).

Muitas cepas de *S. aureus* podem produzir uma cápsula de polissacarídeos (em inglês, *capsular polysaccharide*) para escapar da fagocitose, pois essa cápsula recobre a superfície celular da bactéria, “escondendo” suas proteínas antigênicas. Já foram identificados 13 sorotipos de polissacarídeo capsular, porém os sorotipos 5 e 8 são os predominantemente identificados de isolados clínicos (RAUSCH; DEISINGER; ULM; MÜLLER *et al.*, 2019; VISANSIRIKUL; KOLODZIEJ; DEMCHENKO, 2020). Além disso, estratégias de

agregação celular como formação de biofilme e agregados de fibrina (pela ação da enzima coagulase) recobrando células bacterianas - ClfA e outras proteínas ligadoras de fibrina e fibrinogênio intervêm na interação entre bactéria e coágulos de fibrina - são formas de evitar fagocitose (CHEUNG; BAE; OTTO, 2021; MCADOW; KIM; DEDENT; HENDRICKX *et al.*, 2011).

Inibir a opsonização também é uma estratégia utilizadas por *S. aureus*, já que produzem proteínas de superfície, como a SpA (em inglês, *surface proteína A*), que impedem a ligação de anticorpos à célula, e outras moléculas proteicas que inibem o início da cascata de ativação do sistema complemento (BECKER; FRANKEL; SCHNEEWIND; MISSIAKAS, 2014; BUCHAN; FOSTER; RENSHAW, 2019). A ação de proteases como serino (protease V8), cisteína (SspB) e metaloproteases (exemplo: aureolisina) parecem contribuir para evitar a opsonização (STACH *et al.*, 2018).

Resistir à ação de espécies reativas de oxigênio (em inglês, *Reactive Oxygen Species*, ROS) e outras moléculas tóxicas presentes nos grânulos de neutrófilos e outros leucócitos é outra estratégia de sobrevivência da bactéria. A produção de compostos como (I) a estafiloxantina, responsável por promove a coloração amarelada da colônia bacteriana, anula radicais gerados por ROS; (II) superóxido dismutase e (III) catalase que convertem superóxido e peróxido de hidrogênio em compostos menos ou não tóxicos; (IV) lactato desidrogenase que anula óxido nítrico, além de outros diversos compostos, auxiliam sua sobrevivência no hospedeiro (CHEUNG; BAE; OTTO, 2021; LIU; ESSEX; BUCHANAN; DATTA *et al.*, 2005; NAKONIECZNA; MICHTA; RYBICKA; GRINHOLC *et al.*, 2010).

Toxinas e proteínas que anulam a ação de peptídeos antimicrobianos (do inglês, *antimicrobial peptides*, AMPs) produzidas pelo hospedeiro são muito relevantes na evasão bacteriana. Alfa-toxina, uma citolisina que elimina leucócitos através de lise celular, e a estafilocinase (em inglês, *Staphylokinase*, SAK), uma exoproteína que se liga e inativa a-

defensina (importante AMP produzido por neutrófilos) contra *S. aureus*, mostram-se muito relevantes na sua proteção (BUCHAN; FOSTER; RENSHAW, 2019; JIN; BOKAREWA; FOSTER; MITCHELL *et al.*, 2004).

1.7.2 MECANISMOS DE RESISTÊNCIA DE *Staphylococcus aureus*

Infecções causadas por cepas de *S. aureus* resistentes aos antibióticos, que fazem parte do grupo de patógenos denominados “ESKAPE”, aumentaram significativamente a dificuldade de tratamento (JOHN, 2020; SANTAJIT; INDRAWATTANA, 2016). Inicialmente, muitos antibióticos eram efetivos no tratamento e eliminação de estafilococos, porém a alta pressão seletiva - estimulada pelo uso incorreto desses antimicrobianos - levaram à sobrevivência, prevalência e disseminação de linhagens de *S. aureus* resistentes (WU; LIU; ZHU; SHEN, 2019). Os mecanismos de resistência contra antimicrobianos são respostas celulares integradas que visam adaptação à essas perturbações ambientais e envolvem alterações genômicas, transcriptômicas, proteômicas e metabolômicas nas bactérias (AUTIERO; COSTANTINI; COLONNA, 2009).

A susceptibilidade das infecções por *S. aureus* são tradicionalmente divididas em Meticilina- sensíveis (Methicillin- susceptible *Staphylococcus aureus*, MSSA) e Meticilina- resistentes (Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, MRSA) (JOHN, 2020). As MRSA foram descritas pela primeira vez em 1961 na Inglaterra, logo após o início da utilização da meticilina na clínica (LEE; DE LENCASTRE; GARAU; KLUYTMANS *et al.*, 2018). A implementação da meticilina foi uma alternativa momentânea eficaz para combater bactérias resistentes à penicilina, antibiótico da família dos beta-lactâmicos. Apesar de ambas as moléculas - meticilina e penicilina - serem β -lactâmicos e terem o mesmo alvo na bactéria, isto é, atuarem inibindo as PBPs e, conseqüentemente, a síntese de peptidoglicanos da parede celular, a meticilina não sofre ação das enzimas β -lactamases. Todavia, as bactérias

desenvolveram outros mecanismos de resistência para sobreviver à ação de metilina e outras drogas desenvolvidas posteriormente (AUTIERO; COSTANTINI; COLONNA, 2009; LEE; DE LENCASTRE; GARAU; KLUYTMANS *et al.*, 2018).

Além dos MRSA, ainda são reconhecidos os *S. aureus* resistentes à vancomicina (vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus*, VRSA) e os resistentes à daptomicina (daptomycin-resistant *Staphylococcus aureus*, DRSA) (WU; LIU; ZHU; SHEN, 2019). Essas linhagens resistentes surgem a partir da capacidade da bactéria em criar estratégias e mecanismos de evasão da ação antibiótica, sendo que os principais incluem:

- (1) Produção de enzimas β -lactamases, como a penicilinase, transcrita pelo gene *blaZ*, que hidrolisa a ligação amida do anel β -lactâmico de fármacos β -lactâmicos (exemplo: penicilina e ampicilina), levando à inativação do composto fluoroquinolonas;
- (2) Expressão da proteína ligadora de penicilina 2ª (PBP2a), uma enzima adicional que é produzida pelo gene *mecA* e regulada pelos genes *mecI* e *mecR1*, que não é inibida pelos β -lactâmicos e permite a síntese de peptidoglicanos. O complexo *mecA* pertence ao cassete cromossômico SCC *mec*, considerado uma “ilha” de resistência antimicrobiana, pois permite a integração de genes de resistência e elementos móveis (presente em MRSA);
- (3) Aquisição de resistência por plasmídeo como o operon *vanA*, que promove resistência à glicopeptídeos como a vancomicina, que modifica a sequência final de precursores de peptidoglicanos, reduzindo a afinidade por vancomicina;
- (4) Mutação espontânea na sequência de aminoácidos das enzimas, incluindo a DNA girase e topoisomerase IV, reduzindo a ação de antibióticos fluoroquinolonas como ciprofloxacino;
- (5) Superprodução de lisina-fosfatidilglicerol (em inglês, *lysyl-phosphatidylglycerol*, L-PG) gerado por uma mutação no gene *mrpF*, que produz a proteína integral de membrana MrpF, responsável por adicionar resíduos de lisina e formar L-PG. Esse aumento de L-PG diminui a

carga negativa na superfície celular e reduz a afinidade com antibióticos catiônicos como a daptomicina;

(6) Expressão de bombas de efluxo para expulsar antibiótico do interior da célula;

(7) Redução da permeabilidade celular, reduzindo absorção de fármacos.

Além disso, o desenvolvimento de biofilme e células persistentes, promovem tolerância bacteriana aos antimicrobianos (FOSTER, 2017; GUO; SONG; SUN; WANG *et al.*, 2020; LLARRULL; FISHER; MOBASHERY, 2009; MUNITA; ARIAS, 2016; PANTOSTI; SANCHINI; MONACO, 2007).

Apesar do registro de casos de resistência, a vancomicina continua sendo a escolha inicial de tratamento para infecções de estafilococos resistentes (JOHN, 2020; SANTAJOIT; INDRAWATTANA, 2016). Caso ela não seja efetiva, ainda há penicilinas semi-sintéticas e cefalosporinas disponíveis para terapia alternativa como daptomicina, ceftarolina, fosfomicina, linezolid, dalbavancina, televancina e omadaciclina (JOHN, 2020).

1.7.3 BIOFILME DE *Staphylococcus aureus*

A formação do biofilme dessa bactéria é amplamente encontrada em dispositivos médicos como implantes cardíacas, cateteres urinários e próteses, bem como no tecido vivo do hospedeiro, como osso (causando osteomielite) e válvulas cardíacas (causando endocardite), por exemplo (LISTER; HORSWILL, 2014; MOORMEIER; BAYLES, 2017).

O biofilme de *S. aureus* é comumente constituído de proteínas, DNA extracelular (eDNA) oriundo de bactérias do próprio biofilme e neutrófilos lisados, polissacarídeos extracelulares, ácido teicóico e outras moléculas, apesar da constituição variar entre cepas (PAHARIK; HORSWILL, 2016). Contudo, o maior constituinte dessa matriz é o polissacarídeo de superfície N-acetil-D-glicosamina (PNAG), também identificado como Adesina Polissacarídica Intercelular (do inglês, *polysaccharide intercellular adhesin*, PIA),

produzido por enzimas codificadas pelo locus *icaADBC*. Diversas outras proteínas participam da adesão e montagem da estrutura do biofilme, inclusive em vias alternativas de formação de biofilme independentes de *ica*, como proteínas de superfície e MSCRAMMs, incluindo: proteína A, proteínas ligadoras de fibrinogênio (FnBPA e FnBPB), proteína de superfície de *S. aureus* (SasG) que formam fibras que interconectam células, proteína associada à biofilme (Bap); proteínas secretadas como proteína de aderência extracelular (Eap) e toxina beta. Além disso, eDNA possui uma carga negativa, atuando como polímero eletrostático que ancora células à superfície, à fatores hospedeiros e uns aos outros (LISTER; HORSWILL, 2014).

Para que ocorra a adesão das bactérias em uma superfície abiótica, dando início ao desenvolvimento do biofilme, há uma interação entre as bactérias e o ambiente através de ligações de hidrofobicidade, além da participação de moléculas produzidas por *S. aureus*, como autolisina Atl e ácido teicóico, importantes para essa adesão inicial. Já em uma superfície biótica, as MSCRAMMs são as principais responsáveis por interagir com diferentes compostos da matriz celular do hospedeiro (fibronectina, fibrinogênio, colágeno e citoqueratina) e iniciar essa adesão (MOORMEIER; BAYLES, 2017; OTTO, 2018).

Para a modulação e dispersão do biofilme, há o desempenho de nucleases, proteases, moléculas surfactantes-*like* como modulinas solúveis em fenol (do inglês *staphylococcal phenol-soluble modulins*, PSMs) e peptídeos responsáveis por romper interações não covalentes. Dentre as 10 proteases produzidas por *S. aureus*, estão presentes serino-proteases (SspA e SplA-F), cisteíno proteases (SspB e ScpA) e metaloprotease (Aur) (BOLES; HORSWILL, 2011; OTTO, 2018).

O desprendimento do biofilme parece ser controlado pelo sistema *agr-quorum sensing* que depende da densidade populacional bacteriana e acúmulo de moléculas autoindutoras, como o *autoinducing peptide* (AIP), produzido por *S. aureus* durante o crescimento. Ao atingir altas concentrações, AIP se liga em seu receptor de membrana da bactéria e ativa uma histidina

quinase (AgrC), que fosforila ArgA e inicia a transcrição do operon *agr*. O mesmo produz unidades transcricionais (RNAII e RNA III) que, por sua vez, regulam a expressão de vários fatores de virulência e genes associados ao biofilme, incluindo a produção de proteases que degradam proteínas de superfície celular e rompem a comunicação celular (levando à dispersão) e PSM, toxinas que auxiliam no desenvolvimento da estrutura. Todavia, estudos na literatura relatam que outros mecanismos também podem levar à dispersão do biofilme (BOLES; HORSWILL, 2011; MOORMEIER; BAYLES, 2017; OTTO, 2018; PAHARIK; HORSWILL, 2016; PERIASAMY; JOO; DUONG; BACH *et al.*, 2012).

Além do locus *agr*, o sistema LuxS também é um regulador do QS de estafilococos, apesar de o regulador de gene acessório (Agr) ser o mais bem estabelecido. LuxS regula a produção do autoindutor AI-2, no qual já foi correlacionado com síntese de cápsula, formação de biofilme, susceptibilidade antibiótica e virulência de *S. aureus* (LE; OTTO, 2015). Entretanto, esse sistema é conservado e difundido entre diversas bactérias, além de, como citado anteriormente, AI-2 estar envolvido na comunicação interespecíes, sugestivamente sendo a linguagem universal de comunicação entre as bactérias (XUE; ZHAO; SUN, 2013; ZHAO; XUE; SHANG; SUN *et al.*, 2010)

A constituição e formação do biofilme de *S. aureus* é muito similar ao de *Staphylococcus epidermidis*, enquanto o de bactérias Gram-negativas, como *P. aeruginosa*, grande produtora de biofilme e com altas taxas de resistência e cronicidade de infecções, apresenta o envolvimento de diferentes moléculas para o desenvolvimento das etapas do biofilme, como o observado na Tabela 5. *S. epidermidis* e *P. aeruginosa*, assim como *S. aureus*, são microrganismos comumente associados às infecções com presença de biofilme, especialmente em dispositivos médicos, sendo agentes etiológicos de doenças nosocomiais. Cerca de 80% os microrganismos isolados de materiais médicos contaminados são *S. aureus* e *S. epidermidis* (DONLAN, 2001b; SCHULZE; MITTERER; POMBO; SCHILD, 2021).

Tabela 5. Fatores envolvidos nas diferentes etapas de desenvolvimento do biofilme das bactérias patogênicas *S. aureus*, *S. epidermidis* e *P. aeruginosa*.

Etapa da formação de biofilme	Bactérias patogênicas	
	<i>S. aureus/S. epidermidis</i>	<i>P. aeruginosa</i>
Adesão	Superfície hidrofóbica, ácidos teicóicos, adesinas (ex: Atl, Bap, MSCRAMMs)	Flagelo, motilidade de contração, pili tipo IV, adesinas fimbriais Cup e lectinas
Maturação	Exopolissacarídeos (PIA), eDNA, fatores proteicos e adesinas, ácidos teicóicos	Exopolissacarídeos (alginate, Psl, Pel), eDNA, fatores proteicos (ex: CdrA, LecA/B), ramnolipídeos
Dispersão	Exoproteases (SspA, SplA-F)	Alginato liase, ramnolipídeos, lise celular

Adaptado de SCHULZE; MITTERER; POMBO; SCHILD (2021)

1.8 *Staphylococcus epidermidis*

Bactéria Gram-positiva e coagulase negativa que vive de forma comensal na pele de seres humanos, encontrado predominantemente em axilas, cabeça e nariz. Ele é um patógeno oportunista, pois afeta pacientes com comorbidades, imunocompetente ou imunocomprometido (exemplo: pacientes com HIV, que fazem quimioterapia, transplantados), representando um dos agentes mais frequentemente envolvido com infecções de dispositivos médicos, já que frequentemente essa bactéria - que está presente na pele - é introduzida no corpo do hospedeiro junto com a inserção desses dispositivos. Pode causar diversos quadros clínicos, como infecção sistêmica por disseminação sanguínea, infecção do sistema nervoso central, coração, sítio cirúrgico e articulação protética, por exemplo (BÜTTNER; MACK; ROHDE, 2015; OTTO, 2009).

Apesar de *S. epidermidis* não apresentar a mesma quantidade de fatores de virulência do que *S. aureus*, é capaz de colonizar, evadir o sistema imune e causar infecção (KLEINSCHMIDT; HUYGENS; FAOAGALI; RATHNAYAKE *et al.*, 2015). A patogenicidade desse microrganismo está relacionada com resistência a antimicrobianos, produção de invasinas, atividade hemolítica, atividades de lipases e proteolíticas para invasão e dano do tecido hospedeiro, produção de toxinas, PSMs com potencial de lisar hemácias e

leucócitos e formação de biofilme (OTTO, 2014; SABATÉ BRESCÓ; HARRIS; THOMPSON; STANIC *et al.*, 2017).

As moléculas importantes para a adesão, maturação e dispersão do biofilme de *S. epidermidis* são praticamente as mesmas descritas para *S. aureus*, havendo a presença de moléculas homólogas. A adesão à superfície abiótica envolve a produção de autolisina AtlE (homólogo à Atl em *S. aureus*), além das interações hidrofóbicas inespecíficas e eDNA, *staphylococcal surface protein 1* e 2 (SSP-1 e SSP-2). Em uma superfície biótica ou um dispositivo médico recoberto com proteínas do plasma do hospedeiro, a bactéria consegue interagir com as moléculas de superfície através de suas adesinas e proteínas de superfície celular bacteriana como a MSCRAMMs (há 12 identificadas), permitindo o desenvolvimento da primeira etapa da formação do biofilme. Proteínas Sdr (SdrF, SdrG, SdsH) são MSCRAMMs que foram identificadas em *S. epidermidis*, sendo que SdrG (também chamado de Fbe) é fundamental para a ligação da bactéria com superfícies recobertas com fibrinogênio (BÜTTNER; MACK; ROHDE, 2015; OTTO, 2014; SABATÉ BRESCÓ; HARRIS; THOMPSON; STANIC *et al.*, 2017).

O acúmulo e maturação do biofilme depende, para a maioria das cepas, de PIA, sintetizada pelo locus *icaADBC*, porém algumas cepas são *ica*-independentes e utilizam fatores proteicos como *associated protein* (Aap) para auxiliar a formação do biofilme, ou *biofilm associated homolog protein* (Bhp), *extracellular matrix binding protein* (Embp), e proteínas de superfície SesC e SesE. Assim como várias espécies de *Staphylococcus* spp, *S. epidermidis* também produz PSMs, peptídeos envolvidos na estrutura e dispersão do biofilme, além de proteases e nucleases (OTTO, 2014; 2018; SABATÉ BRESCÓ; HARRIS; THOMPSON; STANIC *et al.*, 2017).(PAHARIK; HORSWILL, 2016).

1.9 *Pseudomonas aeruginosa*

P. aeruginosa é uma bactéria Gram-negativa, encontrada em diversos ambientes, considerado um patógeno oportunista, no qual pode colonizar a pele de seres humanos. Está bastante vinculado às infecções nosocomiais e pneumonia associada a ventilação mecânica em indivíduos com algum comprometimento temporário ou permanente do sistema imune. É conhecido por possuir uma ampla facilidade para adquirir resistência a diversos antibióticos, levando à uma ineficácia das terapias comumente utilizadas na clínica (LISTER; WOLTER; HANSON, 2009; PANG; RAUDONIS; GLICK; LIN *et al.*, 2019).

Dentre os seus fatores de virulência, que auxiliam na adesão, invasão e estabelecimento da infecção no corpo do hospedeiro, destacam-se o pili tipo 4, flagelo, sistema de secreção tipo 3, proteases, lipopolissacarídeos, *quorum sensing* e biofilme. O flagelo único da *P. aeruginosa*, além de promover motilidade, atua como adesina para auxiliar na adesão e também na etapa inicial de formação do biofilme, assim como o pili. O sistema de secreção dessa bactéria (T3SS) possibilita a produção de enzimas hidrolíticas, proteínas e toxinas que lisam as células hospedeiras e ajudam a evadir respostas do sistema imune. Proteases são passíveis de romper junções epiteliais, degradar imunoglobulinas e fibrina, enquanto lipopolissacarídeos protegem a membrana bacteriana, apresentando papel regulador na resposta inflamatória e mediando interações com antibióticos (AZAM; KHAN, 2019; GELLATLY; HANCOCK, 2013).

A habilidade de *P. aeruginosa* em formar biofilme é um importante mecanismo de proteção contra um ambiente estressor, além de impedir a fagocitose e promover sua viabilidade no ambiente por longos períodos (THI; WIBOWO; REHM, 2020). Para adquirirem a forma séssil, essas bactérias perdem sua motilidade e ligam-se às superfícies formando agregados celulares ou microcolônias, cobertos por EPS constituído de proteínas, polissacarídeos, eDNA e lipídeos. No biofilme mucoide de *P. aeruginosa*, os principais componentes da matriz extracelular são exopolissacarídeos Psl, Pel (importantes para interação

célula-célula no biofilme) e alginato (proteção contra fagocitose, radicais livres), importantes para a adesão, desenvolvimento e manutenção do biofilme maduro (CIOFU; TOLKER-NIELSEN, 2019; MORADALI; GHODS; REHM, 2017). Para a dispersão desse biofilme são necessários baixos níveis de segundo mensageiro c-di-GMP (*secondary messenger cyclic diguanosine-5'-monophosphate*), presença de alginato liase, altos níveis de surfactantes ramnolípídeos e lise celular (CIOFU; TOLKER-NIELSEN, 2019; SCHULZE; MITTERER; POMBO; SCHILD, 2021).

O QS de *P. aeruginosa* é regulado através dos sistemas *las*, *rhl*, no qual são responsáveis por sintetizar os autoindutores OdDHL (do inglês, *acylhomoserine lactone N-(3-oxododecanoyl)-homoserine lactone*) e BHL (do inglês *N-butyrylhomoserine lactone*), respectivamente, que ligam-se aos receptores proteicos LasR e RhlR, formando complexos que ativam a expressão de diversos genes que codificam fatores de virulência (LEE; ZHANG, 2015). O sistema PQS (2-heptyl-3-hydroxy-4-quinolone) também está envolvido, sendo sintetizado e transportado via vesículas, ativando a transcrição de genes vinculados a produção de fatores de virulência e formação de biofilme. Há, também, sinalizações intracelulares capazes de integrar as respostas do QS com o estresse ambiental (SCHULZE; MITTERER; POMBO; SCHILD, 2021).

1.10 Terapia antivirulência

As vias utilizadas tradicionalmente por antimicrobianos para eliminar microrganismos visam interromper o crescimento da bactéria através da inibição da síntese de parede celular, da síntese proteica, da replicação do DNA ou pela desestabilização de componentes da membrana. Apesar de serem efetivos, isso estimula o desenvolvimento de estratégias de evasão bacteriana e a pressão seletiva por uso de antibióticos, o que leva às bactérias sensíveis a morrerem e as resistentes a permanecerem viáveis, gerando problemas de saúde pública ao redor de todo o mundo (SILVA; ZIMMER; MACEDO; TRENTIN, 2016).

Como uma alternativa para contornar esse aumento de mecanismos de resistência microbianos, táticas baseadas na inibição de fatores de virulência, ao invés de afetar o crescimento celular, estão sendo investigadas (RASKO; SPERANDIO, 2010). Essa nova abordagem, denominada de “terapia antivirulência”, visa, então, atenuar determinantes de virulência sem matar a bactéria, tendo como benefícios: estímulo reduzido da pressão seletiva pelo fato de a maioria dos fatores de virulência não serem essenciais para a sobrevivência da célula bacteriana; redução da transferência horizontal; evitar o reconhecimento de sinais pró-inflamatórios do hospedeiro por parte da bactéria; inibir fatores importantes para a colonização e para o estabelecimento da infecção bacteriana no corpo do indivíduo (DICKY; CHEUNG; OTTO, 2017; PINTO; BRUST; MACEDO; TRENTIN, 2020; RASKO; SPERANDIO, 2010). Ainda, tem potencial de aumentar o repertório de alvos farmacológicos e estimular a descoberta de novos mecanismos de ação por parte de novos agentes bioativos, podendo ser utilizado em combinação com antibióticos para aumentar os efeitos terapêuticos (SILVA; ZIMMER; MACEDO; TRENTIN, 2016; WU; LIU; ZHU; SHEN, 2019).

Potenciais alvos para a terapia antivirulência incluem fatores de patogenicidade que promovem a adesão e invasão celular, replicação intracelular, danos ao tecido do hospedeiro, adaptação ao estresse, funções metabólicas importantes para adaptação no ambiente, biofilme bacteriano, mecanismos de evasão da resposta imune e controle dos sistemas de regulação da expressão de genes de virulência (MÜHLEN; DERSCH, 2016). Dentre os principais alvos, destacam-se o QS, biofilme, motilidade, toxinas, pigmentos, enzimas e surfactantes (Figura 7).

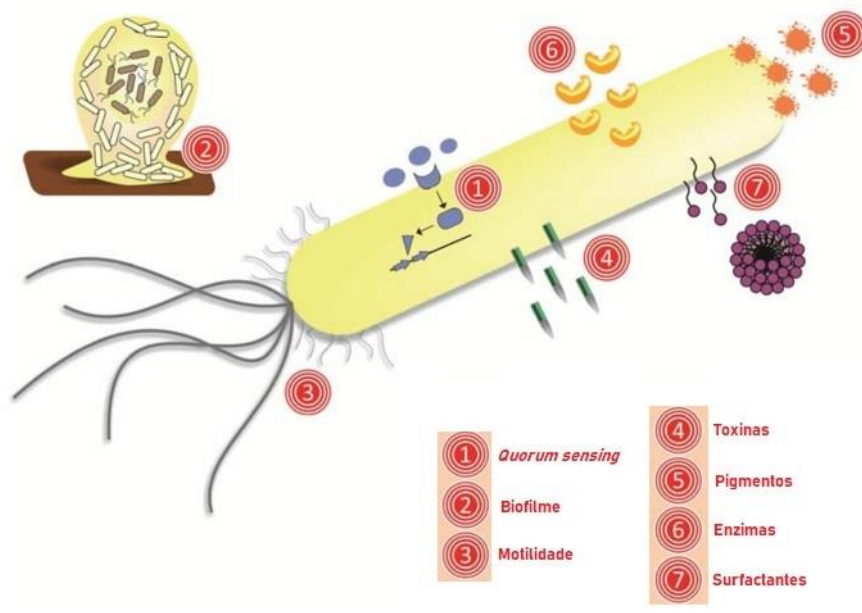


Figura 7. Fatores de virulência bacterianos como potencial alvo de terapia antivirulência. Adaptado de SILVA; ZIMMER; MACEDO; TRENTIN (2016), conforme orientação da Editora (AMERICAN CHEMICAL SOCIETY).

1.10.1 MOLÉCULAS ANTIBIOFILME

As etapas de formação do biofilme podem ser alvos da ação de agentes antibiofilme, prevenindo o seu desenvolvimento (Figura 8). Esses agentes podem atuar sozinhos ou em sinergismo com outras substâncias.



Figura 8. Etapas de formação do biofilme bacteriano. (1) Etapa de adesão das bactérias às superfícies bióticas ou abióticas; (2) Etapa de desenvolvimento e maturação do biofilme no qual inicialmente há a formação de microcolônias, comunicação celular (*quorum sensing*) e início da produção dos polímeros extracelulares; (3) Biofilme maduro do qual as bactérias podem desprender-se para colonizar novo sítios no hospedeiro. Os símbolos vermelhos representam em quais fases do desenvolvimento do biofilme as moléculas ativas podem interferir, inibindo sua formação. Ilustração criada com BioRender.com.

Dentre os agentes naturais com essa função estão os fitoquímicos, como compostos fenólicos, óleos essenciais, terpenóides, alcalóides, polipeptídeos, lectinas e poliacetilenos, biossurfactantes e peptídeos antimicrobianos. Eles podem interferir no biofilme bacteriano através de alguns dos seguintes mecanismos: (1) evitar a adesão bacteriana por bloquear/inibir as proteínas adesinas; (2) evitar o *quorum sensing*; (3) reduzir a motilidade e a produção de exopolissacarídeos; (4) inibir bombas de efluxo; (5) modificar as propriedades físico-químicas da superfície diminuindo a afinidade na adesão; (6) desestabilizar membrana celular e alterar sua hidrofobicidade, permeabilidade e sistema de transporte; (7) reduzir as moléculas de comunicação do QS e de fatores de virulência; (8) alterar proteínas de membrana e interromper transporte no biofilme (MISHRA; PANDA; DE MANDAL; SHAKEEL *et al.*, 2020). Mais especificamente, estudos utilizando moléculas ativas contra biofilme de *S. aureus* descreveram atividades contra o gene regulador *agr* - o sistema *agr* controla o *quorum sensing* e diversos outros fatores de virulência como PSMs -, sistema de enzimas sortase (Srt), via de biossíntese carotenoide (estafiloxantina), outras vias de regulação ou diretamente contra toxinas e receptores de toxinas (FORD; HURFORD; CASSAT, 2020; GAO; HO; YAN; SZE *et al.*, 2018).

No contexto marinho, assim como para as moléculas antibióticas, também já foram identificados metabólitos secretados por bactérias marinhas com atividade contra o biofilme de bactérias patogênicas, como descrito na Tabela 6, incluindo moléculas de bactérias associadas às esponjas marinhas. Atuações sobre o *quorum sensing*, adesão celular e biofilme maduro já foram relatados (BORGES; SIMÕES, 2019; GOWRISHANKAR; DUNCUN MOSIOMA; KARUTHA PANDIAN, 2012; ROY; TIWARI; DONELLI; TIWARI, 2018; SCHULZE; MITTERER; POMBO; SCHILD, 2021).

Tabela 6. Metabólitos produzidos por bactérias marinhas com atividade contra o biofilme de bactérias patogênicas.

Bactéria marinha produtora	Habitat da bactéria marinha	Metabólito identificado	Atividade relacionada	Ref
<i>Actinomycetes</i> spp,	Coral <i>Acropora digitifera</i> do Golfo de Manar (Índia)	Extrato bruto	Inibição da formação de biofilme de <i>S. aureus</i> (cepas clínicas e de referência)	(BAKKIYARA J; PANDIAN, 2010)
Actinomiceto <i>Nesterenkonia</i> sp.	Espunja marinha <i>Fasciospongia cavernosa</i>	Lipopeptídeo denominado Nesfactin	Inibição do biofilme de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	(KIRAN; SAJAYAN; GOPAL PRIYADHARS HINI; BALAKRISHNAN <i>et al.</i> , 2021)
<i>B. amyloliquefaciens</i>	Rizosfera do mangue	Cyclo (L-leucyl-l-prolyl)	Inibição da adesão, motilidade, EPS de <i>Listeria monocytogenes</i>	(GOWRISHAN KAR; SIVARANJANI; KAMALADEVI; RAVI <i>et al.</i> , 2016)
<i>B. amyloliquefaciens</i>	Rizosfera do mangue	Cyclo (L-leucyl-l-prolyl)	Reduz adesão, formação de biofilme e hidrofobicidade celular de <i>Streptococcus mutans</i>	(GOWRISHAN KAR; POORNIMA; PANDIAN, 2014)
<i>B. amyloliquefaciens</i>	Rizosfera do mangue	Cyclo (L-leucyl-l-prolyl)	Inibe QS, motilidade e hidrofobicidade de <i>Serratia marcescens</i>	(GOWRISHAN KAR; PANDIAN; BALASUBRAMANIAM; BALAMURUGAN, 2019)
<i>Bacillus pumilus</i> , <i>B. indicus</i> , <i>B. arsenicus</i> , <i>Halobacillus trueperi</i> , <i>Ferrimonas balearica</i> <i>Marinobacter hydrocarbonoclasticus</i>	Amostras de sedimentos do canal Palk Bay-Índia	Extratos brutos	Dispersão do biofilme maduro de <i>P. aeruginosa</i>	(NITHYA; BEGUM; PANDIAN, 2010)
<i>Bacillus</i> spp, <i>Staphylococcus</i> spp, <i>Pseudomonas</i> spp, <i>Pseudoalteromonas</i> spp e <i>Psychrobacter</i> spp	Espunjas marinhas <i>Psychrobacter</i> sp	Extratos brutos	Atividade antibiofilme via inibição de QS contra <i>P. aeruginosa</i> PA14; Inibição da motilidade de nado e toxina piocianina (<i>P. aeruginosa</i>)	(GUTIÉRREZ-BARRANQUERO; REEN; PARAGES; MCCARTHY <i>et al.</i> , 2019)
<i>Bacillus firmus</i>	Coral <i>Acropora digitifera</i> do Golfo de Manar (Índia)	Extrato bruto	Inibição da formação do biofilme, EPS e hemolisina; modificação das adesinas de cepas MRSA e MSSA	(GOWRISHAN KAR; DUNCUN MOSIOMA; KARUTHA PANDIAN, 2012)
<i>Bacillus licheniformis</i>	Espunja marinha <i>Spongia officinalis</i>	Polissacarídeo	Atividade antibiofilme de <i>Escherichia coli</i> e <i>Pseudomonas fluorescens</i>	(SAYEM; MANZO; CIAVATTA; TRAMICE <i>et al.</i> , 2011)

<i>Rhizobium</i> sp	Superfície de água do Oceano Atlântico Norte	Análogos de <i>Acyl homoserine lactones</i>	Reduz a produção de fatores de virulência e aumenta a suscetibilidade do biofilme de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> por atuar sobre QS.	(CHANG; ZHOU; ZHU; YU <i>et al.</i> , 2017)
<i>Streptomyces</i> sp.	Actinomiceto derivado de esponja marinha	<i>Cinnamic acid; Linear dipeptides proline-glycine; N-amido-α-proline</i>	Interferem em fatores de virulência regulados por QS em <i>P. aeruginosa</i> ATCC27853	(NAIK; WAHIDULLAH; MEENA, 2013)
<i>Streptomyces</i> sp.	Esponja marinha <i>Spirostella</i> sp	Antraquinona 8-O-metyltetrangomycin	Inibiu formação de biofilme de <i>S. aureus</i> em dosagens sub-MIC	(JABILA MARY; KANNAN; INIYAN; RAMACHAN DRAN <i>et al.</i> , 2021)

QS: *quorum sensing*

EPS: *Extracellula polymeric substances*

MIC: *Minimal Inhibitory Concentration*

Nesse contexto, proteínas e enzimas produzidas por microrganismos marinhos mostraram-se efetivos para atividade inibitória contra biofilme de diferentes patógenos: uma proteína denominada BL-DZ1 secretada por *Bacillus licheniformis* D1 apresentou ação contra a formação e a erradicação de biofilme formado de *Candida albicans*, *P. aeruginosa* e *Bacillus pumilus* (DUSANE *et al.*, 2013), assim como uma protease alcalina da bactéria *Pseudoalteromonas* sp. 129-1 que evitou a formação da estrutura de *P. aeruginosa* (WU; LIU; ZHANG; LI *et al.*, 2015); duas amilases, uma produzida por *Bacillus cereus*, sendo eficaz ao inibir biofilme de *S. aureus* e *P. aeruginosa* (VAIKUNDAMOORTHY *et al.*, 2018) e outra sintetizada por *Bacillus subtilis* S8-18, capaz de desmontar EPS em biofilme maduro e ainda atuar na antiformação de MRSA e *Vibrio cholerae* (KALPANA; AARTHY; PANDIAN, 2012).

A utilização de enzimas para romper a EPS de biofilmes bacterianos foi descrito como uma alternativa efetiva para eliminá-los (LEQUETTE; BOELS; CLARISSE; FAILLE, 2010). De fato, as próprias bactérias patogênicas produzem proteases, importantes para regular a dinâmica estrutural, remodelando e dispersando o biofilme, liberando células que retomam sua

forma plactônica e vão colonizar outros locais quando as condições ambientais encontram-se favoráveis (BLACKMAN; QU; CASS; LOCOCK, 2021). Um exemplo disso é a serino-protease Esp secretada por *S. epidermidis*, que atua sobre o próprio biofilme, regulando-o, além de inibir a formação do biofilme de *S. aureus* oriundos da cavidade nasal de seres humanos (IWASE; UEHARA; SHINJI; TAJIMA *et al.*, 2010). Endopeptidase bacteriolisina e metaloendopeptidase lisostafina também são enzimas identificadas com atuação sobre ligações peptídicas que unem as unidades polissacarídicas constituintes dos biofilme de *S. aureus* e *S. epidermidis*. Além disso, foram relatados na literatura enzimas com habilidade de degradar diretamente polissacarídeos, oligossacarídeos e eDNA, e proteínas não-enzimáticas com o mesmo potencial antibiofilme (BLACKMAN; QU; CASS; LOCOCK, 2021).

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVOS GERAL

Identificar metabólitos bioativos produzidos por bactérias isoladas de esponjas marinhas com atividade contra biofilme de bactérias de importância médica.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Permitir a produção de metabólitos bioativos por bactérias marinhas em condições laboratoriais;
- Avaliar o potencial antibiótico e antibiofilme dessas moléculas contra *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* e *Pseudomonas aeruginosa*;
- Caracterizar os compostos bioativos quanto sua origem biológica, química e funcional.
- Analisar a toxicidade dos compostos ativos utilizando modelos *in vivo* (larvas de *Galleria mellonella*) e *in vitro* (eritrócitos humanos).

Os materiais e métodos, além dos resultados da presente tese, serão apresentados em dois capítulos. O primeiro capítulo (item 3.1) relata a busca inicial por metabólitos ativos de bactérias marinhas isoladas em laboratório, com ação inibitória sobre biofilmes de bactérias patogênicas. Já o segundo capítulo trata da descrição da atividade antiformação de biofilme de proteínas produzidas pela bactéria marinha denominada 208 contra a bactéria patogênica *Staphylococcus aureus*. Os resultados desse último capítulo foram apresentados na forma de artigo científico com base nas normas do periódico *Microbial Pathogenesis* (item 3.2).

Rastreamento de metabólitos secundários produzidos por bactérias associadas a esponjas marinhas com potencial antimicrobiano e antiformação de biofilme contra bactérias patogênicas de importância clínica

Nicole Sartori Ribeiro¹, Alexandre José Macedo^{1,2}

¹ Centro de Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil

² Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil

3.1.1 RESUMO

A terapia antivirulência visa utilizar compostos bioativos com capacidade de afetar fatores de virulência bacteriano como o biofilme. O ambiente marinho, bem como os microrganismos marinhos, tem se mostrado inovadores quanto aos compostos que produzem, apresentando diversas atividades biológicas, inclusive antimicrobianas e antibiofilme. Com base nessas informações, o objetivo do presente estudo foi realizar um rastreamento de metabólitos bioativos produzidos por bactérias isoladas de esponjas marinhas com atividade contra bactéria patogênicas de importância clínica. Dos extratos brutos de oito bactérias marinhas selecionadas, duas (BMPV 26 e 210) não apresentaram nenhuma atividade, duas (BMPV 40 e BMPV Mel) apresentaram atividade antibiótica contra *P. aeruginosa*, três (202, 256 e 266) foram antibióticas contra *Staphylococcus. spp* e uma (208) mostrou atividade de inibição da formação de biofilme contra *S. aureus*. Os resultados gerados pelo presente estudo reforçam o potencial biotecnológico e industrial farmacêutico de compostos produzidos por bactérias marinhas.

3.1.2 INTRODUÇÃO

Biofilme bacteriano é definido como uma comunidade de células microbianas envolta por uma matriz de substâncias poliméricas extracelulares (do inglês, *extracellular polymeric substances* - EPS) produzida por essas próprias bactérias, sendo capaz se aderir à superfícies tanto bióticas quanto abióticas (COENYE; GOERES; VAN BAMBEKE; BJARNSHOLT, 2018; DAVIES, 2003; HØIBY, 2014). Essa matriz é composta especialmente por polissacarídeos, proteínas e ácidos nucleicos, apresentando-se como uma estrutura semipermeável, caracterizada pela presença de canais que permitem a nutrição dos microrganismos mais internos. Além disso, assim que as bactérias se estabelecem na forma de vida de biofilme, elas modulam seu metabolismo e expressão gênica na população visando aumentar a sua sobrevivência no corpo do hospedeiro (HICKOK, 2018).

Por aumentarem a resistência bacteriana, os biofilmes tipicamente são responsáveis por causarem e agravarem infecções crônicas, sendo capazes de evadir das respostas do sistema imune e a ação de antibióticos, gerando um quadro persistente e progressivo (HØIBY; BJARNSHOLT; MOSER; BASSI *et al.*, 2015). Muitas dessas infecções persistentes causadas por biofilmes são nosocomiais e estão muito relacionadas com dispositivos médicos, isto é, observa-se um significativo depósito dessas estruturas em cateteres urinários e cardíacos, por exemplo. Dentre os microrganismos mais frequentemente associados à essas contaminações estão *Staphylococcus* spp., especialmente *S. aureus* e *S. epidermidis*, *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*) e *Escherichia coli* (*E. coli*) (DONLAN, 2001; HALL-STOODLEY; COSTERTON; STOODLEY, 2004).

Uma alternativa promissora para combater e controlar as infecções bacterianas é a terapia antivirulência, que consiste em utilizar moléculas bioativas capazes de interferir ou inibir fatores de virulência bacteriano, como o biofilme. As vantagens dessa estratégia incluem utilizar novos mecanismos de ação para agentes antimicrobianos e não estimular a seleção

evolutiva (responsável pelo desenvolvimento de resistência), pois não visa matar a bactéria diretamente, e sim enfraquecê-la (SILVA; ZIMMER; MACEDO; TRENTIN, 2016).

Dentre os ambientes naturais utilizados para pesquisar novas moléculas antimicrobianas, o marinho, que ocupa 70% da biosfera e possui uma grande biodiversidade, tem recebido cada vez mais atenção, sendo que as espécies marinhas vem sendo exploradas como uma fonte de novos produtos naturais bioativos (CHEUNG; NG; WONG, 2015). Microrganismos marinhos vivem em um ambiente considerado severo pela alta concentração de sal, baixas temperaturas e alta pressão, além da restrição de nutrientes, o que propicia uma ampla diversidade genética e biológica com potencial biotecnológico, com a produção de Produtos Marinhos Naturais (do inglês, *marine natural products* – MNP) (DE CARVALHO; FERNANDES, 2010; JIMÉNEZ, 2018; ROMANO; COSTANTINI; SANSONE; LAURITANO *et al.*, 2017).

Já foram identificados metabólitos secundários produzidos por organismos marinhos, como esponjas marinhas e bactérias, com ampla atividade biológica e ação terapêutica, como atividade antimicrobiana e anti-tumoral (ANEIROS; GARATEIX, 2004; BHATNAGAR; KIM, 2010). Mais especificamente, bactérias que residem nas esponjas são capazes de produzir uma variedade de substâncias antibióticas visando inibir ou matar outras concorrentes, das quais podem ser moléculas com potencial para terapêutica humana (PROKSCH; EDRADA; EBEL, 2002; THOMAS; KAVLEKAR; LOKABHARATHI, 2010). Nesse contexto, o objetivo desse estudo foi avaliar a capacidade de bactérias associadas às esponjas marinhas coletadas na costa brasileira em produzirem metabólitos secundários que interfiram no crescimento e biofilme de bactérias patogênicas de importância médica.

3.1.3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1.3.1 *Obtenção das bactérias marinhas e condições de armazenamento*

Parte das bactérias marinhas utilizadas no presente estudo já haviam sido previamente obtidas e isoladas de esponjas marinhas de acordo com o descrito por Trentin *et. al* (2011). De forma breve, as esponjas foram coletadas na Ilha do Arvoredo, Santa Catarina (27°S 16' 42.4"/48°W 22' 30.8") em novembro de 2007 em colaboração com a Fundação Zoobotânica do Rio Grande do Sul (RS) e foram registradas na Coleção de Poríferos no Museu de Ciências Naturais da Fundação Zoobotânica do RS (referência MCNPOR 7831). Uma porção das esponjas foi separada, agitada vigorosamente em água marinha gerando uma solução. 75 µL da solução gerada foi inoculada em diferentes meios de cultura com alta concentração de salina para permitir o crescimento bacteriano. As placas foram incubadas à 22 °C por 72 horas (h), sendo que diferentes colônias bacterianas foram replicadas para obter-se o isolamento das mesmas e posteriormente armazenadas em glicerol à -20 °C. Foram isoladas cerca de 150 colônias bacterianas no total, constituindo uma bacterioteca. A partir dessa coleção, 5 isolados (202, 208, 210, 256 e 266), que no estudo prévio haviam apresentado atividade antibiótica ou antibiofilme, foram selecionados e avaliados quanto ao potencial antivirulência contra bactérias patogênicas neste trabalho.

Além disso, outras 3 bactérias marinhas (BMPV 26, BMPV 40 e BMPV Mel), também comensais de esponjas e utilizadas nesse estudo, foram coletadas em Ponta Verde, Maceió (BR) entre os meses de abril e maio de 2014, em colaboração com o Laboratório de Diversidade Molecular/ICBS da Universidade Federal de Alagoas. O armazenamento das bactérias seguiu o mesmo protocolo previamente descrito.

3.1.3.2 *Identificação das bactérias marinhas*

As bactérias (208, 256, 266 BMPV Mel e BMPV 40) foram identificadas através da técnica de sequenciamento do gene 16S rRNA. As sequências de nucleotídeos conservadas obtidas foram analisadas através do programa RDP (Ribosomal Database Project) para identificação das bactérias por homologia genética (COLE; WANG; FISH; CHAI *et al.*, 2014).

3.1.3.3 *Cultivo e fermentação das bactérias selecionadas*

As cepas bacterianas armazenadas foram inoculadas em ágar marinho (BD Difco, Thermo Fisher Scientific, USA), a fim de mimetizar as concentrações de sais e nutrientes presentes no ambiente marinho, e incubadas à 30 °C por 18 horas. Após esse período, colônias bacterianas foram coletadas com a ajuda de uma alça estéril e diluídas em salina estéril para a geração de um inóculo bacteriano com densidade óptica a 600_{nm} (OD₆₀₀) de 0,500 (SpectraMax M2e Multimode Microplate Reader, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA). 10 mL dos inóculos foram misturados a 90 mL de caldo marinho (Difco) e incubados à 30 °C por 24, 48 e 72 horas. Posteriormente, foram realizadas centrifugações (10.000 rpm à 4 °C por 40 minutos) para separar as células dos metabólitos produzidos e liberados no meio de cultura.

3.1.3.4 *Fracionamento por tamanho dos metabólitos secundários*

Após a obtenção dos extratos brutos bacterianos, foi realizado um passo adicional de fracionamento, no qual esses extratos gerados das fermentações foram filtrados em ultrafiltros Amicon Ultra-15 de 10 kDa (Millipore, USA) através de centrifugação (30 minutos, 5000 g, temperatura ambiente) para a separação de moléculas de baixo peso molecular (metabólitos secundários). Por fim, os extratos teoricamente menores que 10 kDa foram coletados e filtrados com filtros Minisart de poro 0,2 µm (Sartorius Co, Gottingen, Germany) para esterilização e

posteriormente averiguação do potencial antibiótico e antiformação de biofilme contra cepas de bactérias patogênicas formadoras de biofilme.

3.1.3.5 *Condições de cultivos bacterianos para teste*

As cepas bacterianas de importância clínica selecionadas para compor o presente estudo foram *Staphylococcus aureus* Newman (ATCC 25904), *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 35984) e *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853). As bactérias foram crescidas em ágar Muller Hinton (Oxoid Ltd., England) e incubadas por 18 horas à 37 °C. Colônias bacterianas foram coletadas e diluídas em salina estéril (0,9%) e ajustadas para uma concentração correspondente à 1 na escala McFarland, com $OD_{600nm} = 0,150$ (aproximadamente 3×10^8 UFC/mL), que foram utilizadas para todos os testes de avaliação da formação de biofilme.

3.1.3.6 *Verificação da atividade antimicrobiana e antiformação de biofilme dos extratos gerados*

Após a obtenção dos extratos brutos fracionados (EBF) nos diferentes tempos de fermentação e serem realizados os ajustes dos inóculos bacterianos das cepas patogênicas, iniciaram-se os testes de análise antimicrobiana e formação de biofilme através da técnica de cristal violeta (0,4%), previamente descrito por Trentin *et al.*, (2011). Brevemente, foram adicionados à uma placa de 96 poços de poliéster estéril (Costar 3599, Corning Inc., USA) 40 µL de TSB (Tryptic Soy Broth, Oxoid Ltd., England) (com ou sem 1% de glicose), 80 µL dos EBF e 80 µL de solução bacteriana. O sistema foi incubado à 37 °C por 24 h. Realizou-se uma leitura de OD_{600nm} da interação no tempo 0 h (tempo inicial) e após as 24 h (tempo final) para avaliar de forma indireta o crescimento bacteriano.

Em seguida, a placa de cultura foi lavada 3 vezes com salina estéril, seca à 60 °C por 1 h e corada com cristal violeta (0,4%) por 15 minutos. O excesso de corante foi lavado com

água corrente, 200 µL etanol absoluto foi adicionado para solubilizar o corante e uma leitura de OD_{570nm} foi mensurada para a quantificação do biofilme formado. Os antibióticos vancomicina (8 µg/mL), rifampicina (8 µg/mL) e gentamicina (8 µg/mL) foram utilizados como controle antibiótico (morte bacteriana). O controle com adição apenas de salina (não recebeu tratamento) foi considerado como 100% de formação de biofilme para as análises estatísticas.

3.1.3.7 *Teste de erradicação de biofilme*

O ensaio de erradicação de biofilme também utiliza o método de cristal violeta e o protocolo utilizado foi adaptado de Treter *et al.*, (2014). O crescimento do biofilme foi permitido adicionando-se à uma placa de 96 poços 40 µL de TSB, 80 µL de água deionizada estéril e 80 µL de solução bacteriana (OD_{600nm} = 0,150) com uma concentração equivalente a 1 na escala McFarland, que foi incubada à 37 °C. Após 24 h, retirou-se cuidadosamente o conteúdo dos poços e adicionou-se 40 µL TSB, 80 µL dos EBF e 80 µL de água deionizada e incubou-se o sistema por mais 24 h. Após o período, o biofilme remanescente nos poços foi corado com cristal violeta, como descrito anteriormente, e posteriormente quantificado por espectrofotometria (OD_{570nm}). Os testes foram realizados em triplicata biológica.

3.1.3.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram analisados através do programa estatístico GraphPad Prism versão 6.0 para Windows (GraphPad Software, La Jolla California, USA) utilizando os testes de *t-student* ou *one-way* ANOVA para a comparação entre as condições com pós-teste de *Tukey* para análise comparação múltipla. As variáveis quantitativas das replicatas biológicas realizadas em todos os experimentos foram expressas em média e desvio padrão (\pm DP), com $P < 0,05$ para diferenças estatísticas significativas.

3.1.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os extratos brutos das 8 bactérias marinhas selecionadas (202, 208, 210, 256, 266, BMPV 26, BMPV 40 e BMPV Mel) foram avaliados quanto a capacidade de inibir o crescimento e a formação de biofilme de *S. aureus*, *S. epidermidis* e *P. aeruginosa*. Dessas, 2 (210 e BMPV 26) não apresentaram atividade antimicrobiana e não inibiram a formação de biofilme de nenhuma cepa patogênica testada (dado não mostrado). Já o filtrado das outras 6 bactérias (202, 208, 256, 266, BMPV 40 e BMPV Mel) apresentaram atividade contra, pelo menos, uma das bactérias, como descrito na Tabela 1.

Tabela 1: Resultado do rastreamento de atividade antibiótica e antif formação de biofilme dos extratos brutos de bactérias marinhas menores que 10 kDa contra cepas de bactérias patogênicas.

Extrato bruto fracionado	Identidade (%similaridade)	Bactérias patogênicas		
		<i>S. aureus</i>	<i>S. epidermidis</i>	<i>P. aeruginosa</i>
202	Não identificado	Antibiótico	NA	NA
208	<i>Priestia. sp</i> (99%)	Antif formação de biofilme	NA	NA
210	Não identificado	NA	NA	NA
256	<i>Bacillus. spp</i> (100%)	NA	Antibiótico	NA
266	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> (98,6%)	Antibiótico	NA	NA
BMPV 26	Não identificado	NA	NA	NA
BMPV 40	<i>Vibrio alginolyticus</i> (99%)	NA	NA	Antibiótico
BMPV Mel	<i>Bacillus stratosphericus</i> (92%)	NA	NA	Antibiótico

NA: não ativo

Todos os extratos, antes de serem testados, foram previamente fracionados com ultrafiltro para a separação de moléculas menores do que 10 kDa, pois metabólitos secundários, particularmente peptídeos, eram visados inicialmente por este estudo pelo fato de peptídeos ativos, em especial os produzidos por organismos marinhos, apresentarem uma ampla gama de bioatividade, incluindo atividades antioxidantes, antitumorais, antimicrobianas e antibiofilme, já descritas (CHEUNG; NG; WONG, 2015; FREITAS; RANGEL; BISSON; JAEGER *et al.*,

2008; GOWRISHANKAR; DUNCUN MOSIOMA; KARUTHA PANDIAN, 2012; JIAO; GAO; ZHOU; YU *et al.*, 2019; SUAREZ-JIMENEZ; BURGOS-HERNANDEZ; EZQUERRA-BRAUER, 2012). Bactérias marinhas ativamente sintetizam peptídeos de baixo peso molecular como metabólitos secundários, porém sua atividade anti-infecção depende das propriedades estruturais, composição e sequência de aminoácidos, além das condições ambientais da bactéria produtora (ANDRYUKOV; MIKHAILOV; BESEDNOVA, 2019).

Além do mais, a separação dos extratos brutos em frações menores é um método utilizado para aumentar a eficácia na identificação de compostos ativos, miniaturizando a escala, torna-os mais apropriados para manuseio em um sistema automatizado – considerando uma aplicação tecnológica - e acelerando o processo de análise (ATANASOV; ZOTCHEV; DIRSCH; SUPURAN *et al.*, 2021; HARVEY; EDRADA-EBEL; QUINN, 2015). Também, o fracionamento auxilia no isolamento de moléculas, pois retira interferentes e eventualmente aumenta suas atividades, reduzindo a complexidade do extrato (ISSAQ; VEENSTRA, 2020; WAGENAAR, 2008; HARVEY; EDRADA-EBEL; QUINN, 2015).

A maioria dos EBF ativos testados no presente estudo apresentou atividade antibiótica contra cepas Gram-positivas (Fig. 1) e Gram-negativa (Fig. 2) e, como uma consequência dessa inibição de crescimento bacteriano, houve uma menor formação de biofilme. Dentre as atividades antibióticas, destaca-se a ação da BMPV 40, identificada pelo gene 16S rRNA como *Vibrio alginolyticus* (99% de similaridade), que inibiu o crescimento em 40% da *P. aeruginosa* com o extrato de 24 h de fermentação. *P. aeruginosa* é um microrganismo de grande importância clínica, já que está bastante associada à infecções nosocomiais e apresenta uma alta capacidade de desenvolver resistência à diversos antibióticos utilizados atualmente, sendo que a descoberta de novas moléculas e alternativas terapêuticas são requeridas para combater as infecções causadas por essa bactéria (GUZZO; SCOGNAMIGLIO; FIORENTINO; BUOMMINO *et al.*, 2020; PANG; RAUDONIS; GLICK; LIN *et al.*, 2019).

Antiformação de biofilme

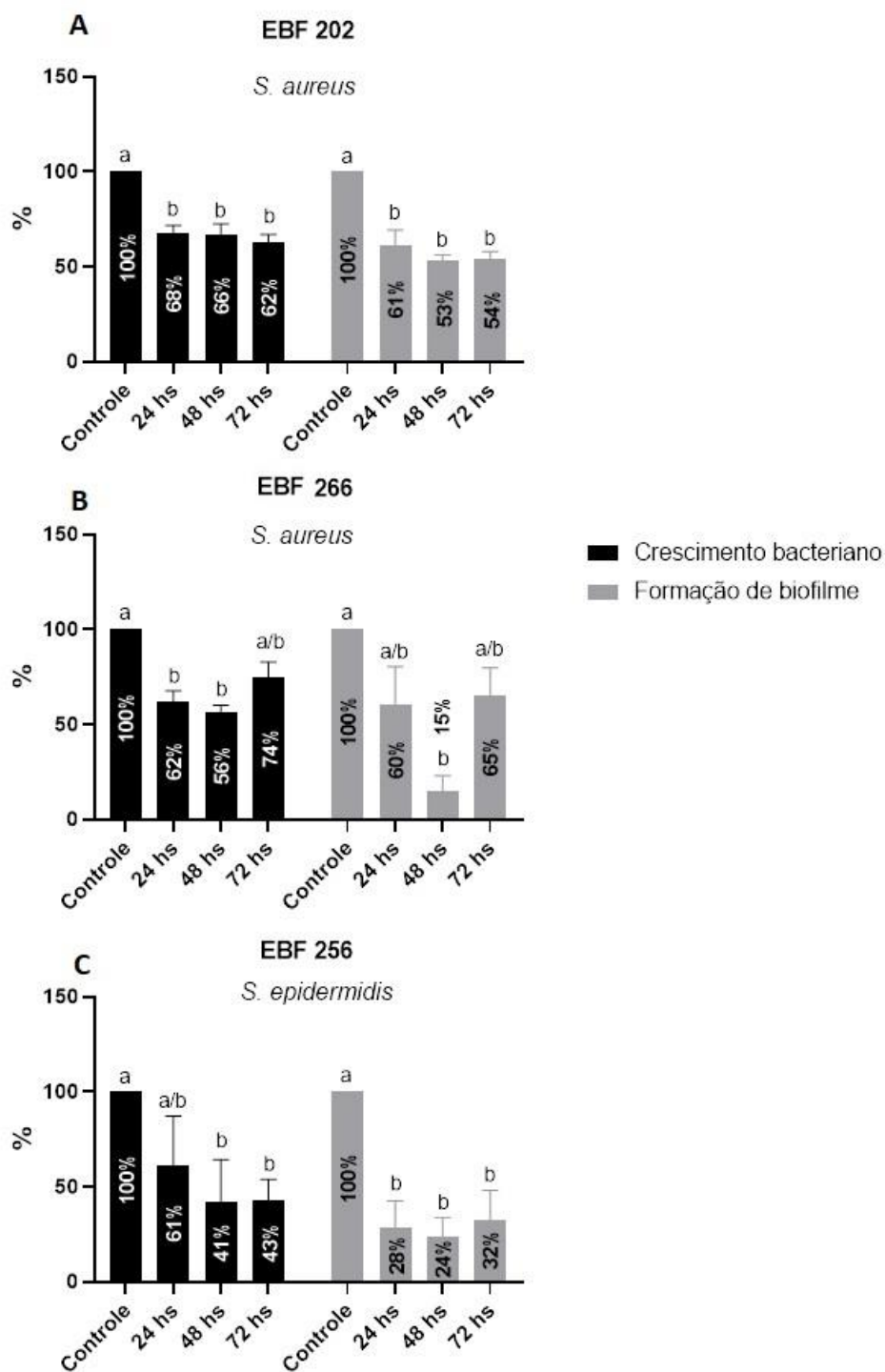


Fig. 1: Atividade antibiótica dos EBF ativos contra bactérias Gram-positivas. Extrato bruto fracionado (EBF) de metabólitos secundários (menores que 10 kDa), com atividade de inibição de crescimento bacteriano, produzidos pelas bactérias marinhas 202 (A) e 266 (B) contra *S. aureus* e 256 (C) contra *S. epidermidis*. Os símbolos (⊖) representam o desvio padrão das replicatas dos testes e as % referem-se à quantidade de bactérias (barras pretas) ou biofilme (barras cinzas) remanescentes comparados com a condição controle. Controle com salina foi considerado 100% de crescimento bacteriano e 100% de formação de biofilme. As letras as diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) através do teste *one-way* ANOVA e pós-teste de *Turkey*.

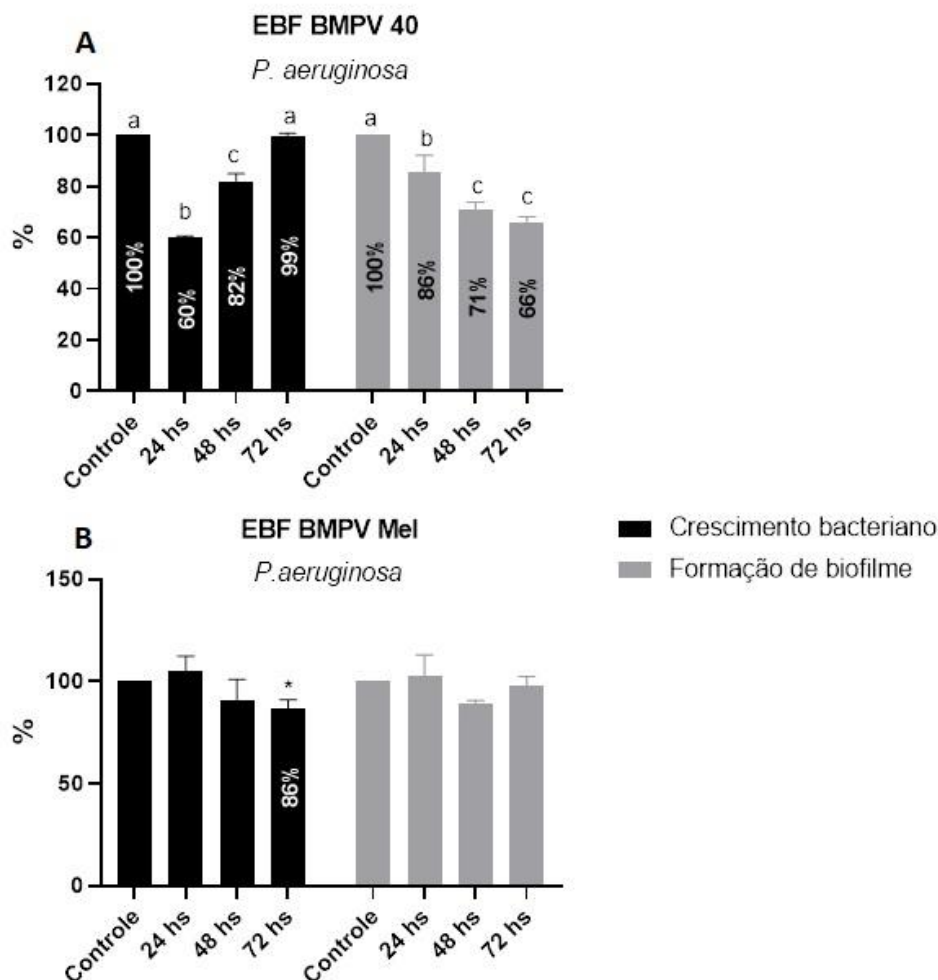


Fig. 2: Atividade antibiótica dos EBF ativos contra *P. aeruginosa*. Extrato bruto fracionado menores que 10 kDa produzido pelas bactérias marinhas BMPV 40 (A) e BMPV Mel (B) com atividade antibiótica contra *P. aeruginosa*. símbolos (⊥) representam o desvio padrão das replicatas e as % a concentração bacteriana (barras pretas) ou biofilme (barras cinzas) remanescentes comparados com o controle. Controle com salina foi considerado 100% de crescimento bacteriano e 100% de formação de biofilme. Análise estatística realizada com o teste *one-way* ANOVA e análise múltipla com teste de *Turkey*, com letras representando diferença estatística ($p < 0,001$) e $*p < 0,006$.

A identificação de moléculas com atividades antibióticas neste estudo, oriundas da prospecção de moléculas ativas sintetizadas por bactérias comensais de esponjas marinhas, assemelham-se a outros estudos realizados no Brasil. Um desses trabalhos relatou que de 9 esponjas -coletadas do Arquipélago Cagarras e Praia Vermelha no Rio de Janeiro (RJ)- foram isoladas 158 colônias bacterianas, e apenas 12 (9%) tiveram atividade contra pelo menos uma cepa teste. A maioria dos gêneros bacterianos que sintetizaram ativos foram *Pseudomonas* e

Bacillus spp, apresentando ação antimicrobiana contra Gram-positivas e Gram-negativas, incluindo *Enterococcus faecium* resistente à vancomicina, *Klebsiella pneumoniae* multirresistente, *S. aureus* e *S. epidermidis*. De acordo, outro estudo também realizado no RJ, no qual as esponjas do gênero *Oscarella* foram coletadas das ilhas de Pargos e Comprida em Cabo Frio, 85 colônias foram isoladas e dessas, 27 apresentaram ação antimicrobiana contra *S. aureus*, *S. aureus* resistente à metilina (MRSA, do inglês methicillin-resistant *S. aureus*), *Staphylococcus hominis*, *Escherichia coli*, *E. faecium* e *P. aeruginosa*. As atividades detectadas foram mais evidentes entre os gêneros bacterianos *Acinetobacter*, *Bacillus*, *Photobacterium*, *Shewanella* e *Vibrio* spp. como produtores (LAPORT; BAUWENS; DE OLIVEIRA NUNES; WILLENZ *et al.*, 2017).

Entretanto, apesar da relevância das atividades antibióticas encontradas, o nosso estudo teve como objetivo principal encontrar moléculas com ação antifilme de biofilme que não interferissem na multiplicação bacteriana, visando a aplicação disso na terapia antivirulência, ou seja, moléculas que atuem sobre fatores de virulência bacterianos para enfraquecê-las e deixá-las suscetíveis à ação de antibióticos e do sistema imune do hospedeiro (MÜHLEN; DERSCH, 2016; SILVA; ZIMMER; MACEDO; TRENTIN, 2016). Esse tipo de atividade foi observado apenas para o EBF de 24 h produzido pela bactéria 208 (*Priestia* sp., antigamente pertencente ao gênero *Bacillus* sp.) contra *S. aureus*, indicando uma produção de metabólitos que não interferiram significativamente no crescimento exponencial bacteriano (inibição apenas de 7%), porém inibiram a formação de biofilme em 70% (Fig.3).

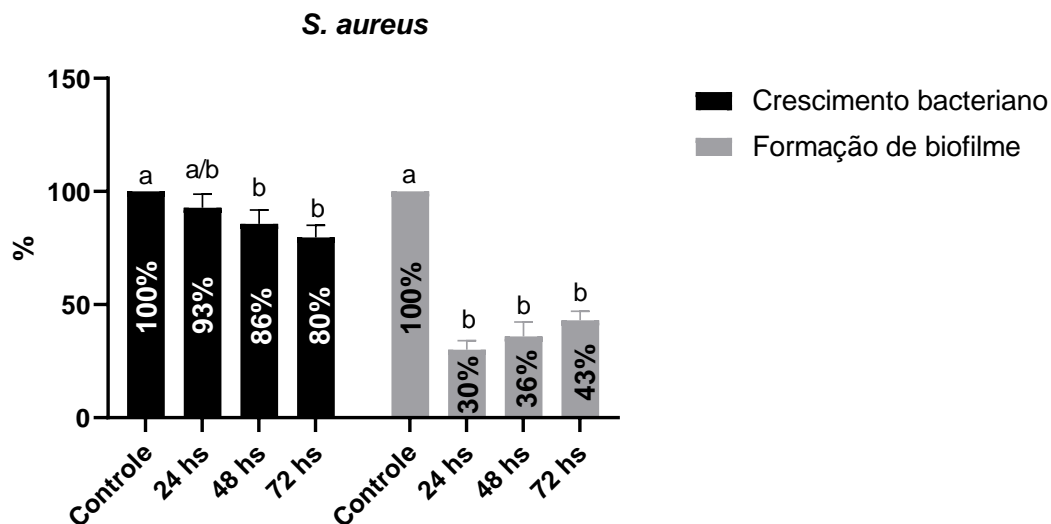


Fig. 3: EBF da bactéria marinha 208 (*Priestia* sp.) com atividade antiformação de biofilme contra *S. aureus*. Extrato bruto fracionado por ultrafiltro, com a presença de metabólitos menores que 10 kDa (produzidos pela bactéria marinha 208), apresentando atividade de inibição do biofilme de *S. aureus* Newman, e interferindo minimamente no crescimento bacteriano da cepa testada. Os símbolos acima das barras (\uparrow) representam o desvio padrão das médias das triplicatas biológicas e as % indicam a concentração bacteriana (barras pretas) ou quantidade de biofilme (barras cinzas) remanescentes comparado com o controle. Controle não tratado foi considerado como 100% de crescimento bacteriano e 100% de formação de biofilme. As diferentes letras (a, b) representam a diferença estatística significativa entre as condições testadas com $p < 0,0001$, averiguadas pelo teste de *one-way* ANOVA e análise múltipla com pós-teste de *Turkey*.

Em paralelo, os compostos ativos produzidos pelas bactérias 208, 256, 266 e BMPV 40 foram avaliados quanto a capacidade de erradicar o biofilme maduro das mesmas bactérias patogênicas que previamente foram sensíveis aos seus metabólitos. Enquanto os extratos de 256 e BMPV 40 não mostraram atividade contra o biofilme maduro de *S. epidermidis* e *P. aeruginosa*, respectivamente, os EBF das bactérias 208 e 266, em todos os tempos de fermentação testados, estatisticamente desfizeram a estrutura, atingindo um máximo de 58% (208) e 77% (266) de ruptura do biofilme de *S. aureus*, respectivamente (Fig. 4).

Erradicação de biofilme

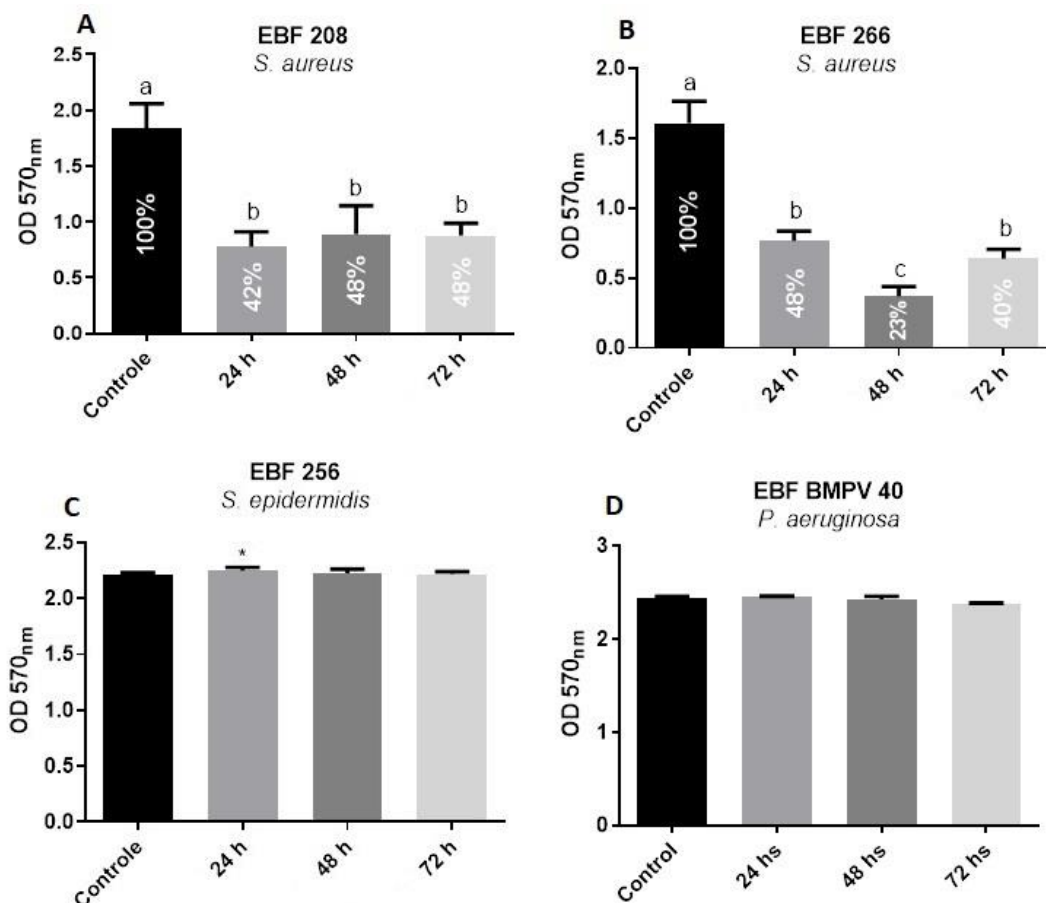


Fig. 4: Erradicação de biofilme maduro de bactérias patogênicas. EBF das bactérias marinhas associadas às esponjas marinhas 208 (A) e 266 (B) testados para atividade de erradicação de biofilme de *S. aureus*; EBF 256 testado contra biofilme de *S. epidermidis* (C) e bactéria BMPV 40 avaliado para *P. aeruginosa* (D). A condição controle (com salina) representou 100% de biofilme maduro formado. Os símbolos acima das barras (⊥) representam o desvio padrão das médias das replicatas dos testes. As diferentes letras (a, b) representam a diferenças significativamente estatísticas entre as condições testadas, através do teste de *one-way* ANOVA e pós-teste de *Turkey* ($p < 0,0001$).

Recentemente um estudo relatou o potencial de metabólitos produzidos pela bactéria *Enterococcus* sp. associada a esponja marinha do gênero *Oscarella*, coletada em Cabo Frio no Rio de Janeiro – Brasil (mesma amostragem do estudo de Nunes *et al.* citado anteriormente), como agente antibiofilme, apresentando erradicações de 66 a 94% contra cepas de *S. aureus* e *S. epidermidis*, tanto contra cepas controle quanto isolados clínicos (NUNES; ROSA; CANELLAS; ROMANOS *et al.*, 2021). Esse dado, assim como os resultados deste presente estudo, reforçam o potencial desses microrganismos marinhos em produzir substâncias

bioativas com implicância na área farmacêutica e biotecnológica, considerando uma abordagem antivirulência, estando de acordo também com outros estudos já relatados na literatura (ARTINI; PAPA; VRENNA; LAURO *et al.*, 2019; BALASUBRAMANIAN; OTHMAN; KAMPIK; STOPPER *et al.*, 2017; KIRAN; SAJAYAN; GOPAL PRIYADHARSHINI; BALAKRISHNAN *et al.*, 2021; SAYEM; MANZO; CIAVATTA; TRAMICE *et al.*, 2011). Além disso, identificar moléculas capazes de romper biofilmes maduros é de extrema relevância na área de implantes médicos, como cateteres intravasculares, que são constantemente colonizados por biofilmes bacterianos, especialmente *Staphylococcus* spp., gerando uma infecção crônica com alta morbidade e mortalidade de indivíduos (ZAPOTOCZNA; FORDE; HOGAN; HUMPHREYS *et al.*, 2017).

Portanto, pode-se afirmar que os microrganismos que habitam de forma comensal as esponjas marinhas apresentam um significativo potencial em sintetizar compostos tanto antibióticos quanto antifilme. Esses dados, então, podem contribuir para a exploração dessa fonte natural com intuito de identificar novos e efetivos agentes antimicrobianos.

3.1.5 CONCLUSÃO

Microrganismos marinhos, mais especificamente bactérias associadas às esponjas marinhas, apresentam uma produção de metabólitos com amplo repertório de atividades biológicas, inclusive antimicrobiana, antifilme e erradicação de biofilme de bactérias patogênicas relevantes em infecções nosocomiais e crônicas. Sendo assim, são considerados uma promissora fonte natural de exploração para o descobrimento de novas moléculas ativas.

REFERÊNCIAS

ANDRYUKOV, B.; MIKHAILOV, V.; BESEDNOVA, N. The Biotechnological Potential of Secondary Metabolites from Marine Bacteria. **Journal of Marine Science and Engineering**, 7, p. 176, 2019.

ANEIROS, A.; GARATEIX, A. Bioactive peptides from marine sources: pharmacological properties and isolation procedures. **J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci**, 803, n. 1, p. 41-53, Apr 2004.

ARTINI, M.; PAPA, R.; VRENNA, G.; LAURO, C. *et al.* Cold-adapted bacterial extracts as a source of anti-infective and antimicrobial compounds against. **Future Microbiol**, 14, p. 1369-1382, 11 2019.

ATANASOV, A. G.; ZOTCHEV, S. B.; DIRSCH, V. M.; SUPURAN, C. T. *et al.* Natural products in drug discovery: advances and opportunities. **Nat Rev Drug Discov**, 20, n. 3, p. 200-216, 03 2021.

BALASUBRAMANIAN, S.; OTHMAN, E. M.; KAMPIK, D.; STOPPER, H. *et al.* Marine Sponge-Derived. **Front Microbiol**, 8, p. 236, 2017.

BHATNAGAR, I.; KIM, S. K. Immense essence of excellence: marine microbial bioactive compounds. **Mar Drugs**, 8, n. 10, p. 2673-2701, Oct 2010.

CHEUNG, R. C.; NG, T. B.; WONG, J. H. Marine Peptides: Bioactivities and Applications. **Mar Drugs**, 13, n. 7, p. 4006-4043, Jun 2015.

COENYE, T.; GOERES, D.; VAN BAMBEKE, F.; BJARNSHOLT, T. Should standardized susceptibility testing for microbial biofilms be introduced in clinical practice? **Clin Microbiol Infect**, 24, n. 6, p. 570-572, Jun 2018.

COLE, J. R.; WANG, Q.; FISH, J. A.; CHAI, B. *et al.* Ribosomal Database Project: data and tools for high throughput rRNA analysis. **Nucleic Acids Res**, 42, n. Database issue, p. D633-642, Jan 2014.

DAVIES, D. Understanding biofilm resistance to antibacterial agents. **Nat Rev Drug Discov**, 2, n. 2, p. 114-122, Feb 2003.

DE CARVALHO, C. C.; FERNANDES, P. Production of metabolites as bacterial responses to the marine environment. **Mar Drugs**, 8, n. 3, p. 705-727, Mar 2010.

DONLAN, R. M. Biofilms and device-associated infections. **Emerg Infect Dis**, 7, n. 2, p. 277-281, 2001 Mar-Apr 2001.

FREITAS, V. M.; RANGEL, M.; BISSON, L. F.; JAEGER, R. G. *et al.* The geodiamolide H, derived from Brazilian sponge *Geodia corticostylifera*, regulates actin cytoskeleton, migration and invasion of breast cancer cells cultured in three-dimensional environment. **J Cell Physiol**, 216, n. 3, p. 583-594, Sep 2008.

GOWRISHANKAR, S.; DUNCUN MOSIOMA, N.; KARUTHA PANDIAN, S. Coral-Associated Bacteria as a Promising Antibiofilm Agent against Methicillin-Resistant and -

Susceptible *Staphylococcus aureus* Biofilms. **Evid Based Complement Alternat Med**, 2012, p. 862374, 2012.

GUZZO, F.; SCOGNAMIGLIO, M.; FIORENTINO, A.; BUOMMINO, E. *et al.* Plant Derived Natural Products against. **Molecules**, 25, n. 21, Oct 2020.

HALL-STOODLEY, L.; COSTERTON, J. W.; STOODLEY, P. Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. **Nat Rev Microbiol**, 2, n. 2, p. 95-108, Feb 2004.

HARVEY, A. L.; EDRADA-EBEL, R.; QUINN, R. J. The re-emergence of natural products for drug discovery in the genomics era. **Nat Rev Drug Discov**, 14, n. 2, p. 111-129, Feb 2015.

HICKOK, N. J. What are Biofilms? **Spine (Phila Pa 1976)**, 43, n. 7, p. S7-S8, 04 2018.

HØIBY, N. A personal history of research on microbial biofilms and biofilm infections. **Pathog Dis**, 70, n. 3, p. 205-211, Apr 2014.

HØIBY, N.; BJARNSHOLT, T.; MOSER, C.; BASSI, G. L. *et al.* ESCMID guideline for the diagnosis and treatment of biofilm infections 2014. **Clin Microbiol Infect**, 21 Suppl 1, p. S1-25, May 2015.

ISSAQ, H. J.; VEENSTRA, T. D. Chapter 6 - Sample depletion, fractionation, and enrichment for biomarker discovery. *In*: ISSAQ, H. J. e VEENSTRA, T. D. (Ed.). **Proteomic and Metabolomic Approaches to Biomarker Discovery (Second Edition)**. Boston: Academic Press, 2020. p. 95-102.

JIAO, K.; GAO, J.; ZHOU, T.; YU, J. *et al.* Isolation and purification of a novel antimicrobial peptide from *Porphyra yezoensis*. **J Food Biochem**, 43, n. 7, p. e12864, 07 2019.

JIMÉNEZ, C. Marine Natural Products in Medicinal Chemistry. **ACS Med Chem Lett**, 9, n. 10, p. 959-961, Oct 2018.

KIRAN, G. S.; SAJAYAN, A.; GOPAL PRIYADHARSHINI; BALAKRISHNAN, A. *et al.* A novel anti-infective molecule nesfatin identified from sponge associated bacteria *Nesterenkonia* sp. MSA31 against multidrug resistant *Pseudomonas aeruginosa*. **Microb Pathog**, 157, p. 104923, Aug 2021.

LAPORT, M. S.; BAUWENS, M.; DE OLIVEIRA NUNES, S.; WILLENZ, P. *et al.* Culturable bacterial communities associated to Brazilian *Oscarella* species (Porifera: Homoscleromorpha) and their antagonistic interactions. **Antonie Van Leeuwenhoek**, 110, n. 4, p. 489-499, Apr 2017.

MÜHLEN, S.; DERSCH, P. Anti-virulence Strategies to Target Bacterial Infections. **Curr Top Microbiol Immunol**, 398, p. 147-183, 2016.

NUNES, S. O.; ROSA, H. D. S.; CANELLAS, A. L. B.; ROMANOS, M. T. V. *et al.* High reduction of staphylococcal biofilm by aqueous extract from marine sponge-isolated *Enterobacter* sp. **Res Microbiol**, 172, n. 1, p. 103787, 2021 Jan-Feb 2021.

- PANG, Z.; RAUDONIS, R.; GLICK, B. R.; LIN, T. J. *et al.* Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: mechanisms and alternative therapeutic strategies. **Biotechnol Adv**, 37, n. 1, p. 177-192, 2019 Jan - Feb 2019.
- PROKSCH, P.; EDRADA, R. A.; EBEL, R. Drugs from the seas - current status and microbiological implications. **Appl Microbiol Biotechnol**, 59, n. 2-3, p. 125-134, Jul 2002.
- ROMANO, G.; COSTANTINI, M.; SANSONE, C.; LAURITANO, C. *et al.* Marine microorganisms as a promising and sustainable source of bioactive molecules. **Mar Environ Res**, 128, p. 58-69, Jul 2017.
- SAYEM, S. M.; MANZO, E.; CIAVATTA, L.; TRAMICE, A. *et al.* Anti-biofilm activity of an exopolysaccharide from a sponge-associated strain of *Bacillus licheniformis*. **Microb Cell Fact**, 10, p. 74, Sep 2011.
- SILVA, L. N.; ZIMMER, K. R.; MACEDO, A. J.; TRENTIN, D. S. Plant Natural Products Targeting Bacterial Virulence Factors. **Chem Rev**, 116, n. 16, p. 9162-9236, Aug 2016.
- SUAREZ-JIMENEZ, G. M.; BURGOS-HERNANDEZ, A.; EZQUERRA-BRAUER, J. M. Bioactive peptides and depsipeptides with anticancer potential: sources from marine animals. **Mar Drugs**, 10, n. 5, p. 963-986, May 2012.
- THOMAS, T. R.; KAVLEKAR, D. P.; LOKABHARATHI, P. A. Marine drugs from sponge-microbe association--a review. **Mar Drugs**, 8, n. 4, p. 1417-1468, Apr 2010.
- TRENTIN, D. S.; GORZIZA, D. F.; ABRAHAM, W. R.; ANTUNES, A. L. *et al.* Antibiofilm activity of *Cobetia marina* filtrate upon *Staphylococcus epidermidis* catheter-related isolates. **Braz J Microbiol**, 42, n. 4, p. 1329-1333, Oct 2011.
- TRETER, J.; BONATTO, F.; KRUG, C.; SOARES, G. V. *et al.* Washing-resistant surfactant coated surface is able to inhibit pathogenic bacteria adhesion. **Applied Surface Science**, 303, p. 147-154, 2014/06/01/ 2014.
- WAGENAAR, M. M. Pre-fractionated microbial samples--the second-generation natural products library at Wyeth. **Molecules**, 13, n. 6, p. 1406-1426, Jun 20 2008.
- ZAPOTOCZNA, M.; FORDE, É.; HOGAN, S.; HUMPHREYS, H. *et al.* Eradication of *Staphylococcus aureus* Biofilm Infections Using Synthetic Antimicrobial Peptides. **J Infect Dis**, 215, n. 6, p. 975-983, 03 2017.

Unveiling Antibiofilm Potential: Proteins from *Priestia* sp. Targeting *Staphylococcus aureus* Biofilm Formation

Nicole Sartori Ribeiro¹, Deisiane Fernanda da Rosa¹, Marina Amaral Xavier¹, Sharon Vieira dos Reis¹, Walter O. Beys-da-Silva², Lucélia Santi², Cristiano Valim Bizarro³, Pedro Ferrari Dalberto³, Luiz Augusto Basso³, Alexandre José Macedo^{1,2*}

¹Nicole Sartori Ribeiro. Centro de Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil. E-mail: nicole.sari@hotmail.com. ORCID: 0000-0002-7239-0584

¹Deisiane Fernanda da Rosa. Centro de Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil. E-mail: deisianefernandadarosa@gmail.com. ORCID: 0009-0002-3022-0795

¹Marina Amaral Xavier. Centro de Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil. E-mail: xaviermarinaa@gmail.com. ORCID: 0000-0001-7768-1471

¹Sharon Vieira dos Reis. Centro de Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil. E-mail: sharonvreis@hotmail.com. ORCID: 0000-0003-4844-5685

²Walter O. Beys-da-Silva. Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil. E-mail: walter.beys@ufrgs.br. ORCID: 0000-0001-8329-7839

²Lucélia Santi. Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil. E-mail: lucelia.santi@ufrgs.br. ORCID: 0000-0002-5698-7006

³Cristiano Valim Bizarro. Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Tuberculose (INCT-TB), Centro de Pesquisas em Biologia Molecular e Funcional (CPBMF), and Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS), 92A TECNOPUC, Av. Ipiranga 6681, Partenon, 90616-900, Porto Alegre, Brazil. E-mail: cristiano.bizarro@pucrs.br ORCID: 0000-0002-2609-8996

³Pedro Ferrari Dalberto. Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Tuberculose (INCT-TB), Centro de Pesquisas em Biologia Molecular e Funcional (CPBMF), Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS), 92A TECNOPUC, Av. Ipiranga 6681, Partenon, 90616-900, Porto Alegre, Brazil. E-mail: ORCID: 0000-0002-0929-6739

³Luiz Augusto Basso. Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Tuberculose (INCT-TB), Centro de Pesquisas em Biologia Molecular e Funcional (CPBMF), and Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS), 92A TECNOPUC, Av. Ipiranga 6681, Partenon, 90616-900, Porto Alegre, Brazil. E-mail: ORCID: 0000-0003-0903-2407

^{1,2*}Alexandre José Macedo. Centro de Biotecnologia and Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil. E-mail: alexandre.macedo@ufrgs.br. ORCID: 0000-0002-8951-4029

* Corresponding author.

Av. Ipiranga, 2752 - CEP 90610-000 - Porto Alegre – RS

E-mail address: alexandre.macedo@ufrgs.br

Phone: +55 (51) 3308 5354/+55 (51) 3308 6082

Abstract

Staphylococcus aureus is the etiologic agent of many nosocomial infections, and its biofilm is frequently isolated from medical devices. Moreover, the dissemination of multidrug-resistant (MDR) strains from this pathogen, such as methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) strains, is a worldwide public health issue. The inhibition of biofilm formation can be used as a strategy to weaken bacterial resistance. Taking that into account, we analysed the ability of marine sponge-associated bacteria to produce antibiofilm molecules, and we found that marine *Priestia* sp., isolated from marine sponge *Scopalina* sp. collected on the Brazilian coast, secretes proteins that impair biofilm development from *S. aureus*. Partially purified proteins (PPP) secreted after 24 hours of bacterial growth promoted a 92% biofilm mass reduction and 4.0 µg/dL was the minimum concentration to significantly inhibit biofilm formation. This reduction was visually confirmed by light microscopy and Scanning Electron Microscopy (SEM). Furthermore, biochemical assays showed that the antibiofilm activity of PPP was reduced by ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) and 1,10 phenanthroline (PHEN), while it was stimulated by zinc ions, suggesting an active metallopeptidase in PPP. This result agrees with mass spectrometry (MS) identification, which indicated the presence of a metallopeptidase from the M28 family. Additionally, whole-genome sequencing analysis of *Priestia* sp. shows that gene *ywad*, a metallopeptidase-encoding gene, was present. Therefore, the results presented herein indicate that PPP secreted by the marine *Priestia* sp. can be explored as a potential antibiofilm agent and help to treat chronic infections.

Keywords: Antibiofilm, antivirulence therapy, marine molecules, marine sponge-associated bacteria, metalloprotease,

Introduction

A bacterial biofilm is defined as a bacterial community that lives covered by an extracellular polymeric substances (EPS) matrix produced by themselves (Davies 2003; Høiby 2014; Yin et al. 2019; Hall-Stoodley et al. 2012). The matrix is composed mostly of polysaccharides and nucleic acids, characterised as a semipermeable structure with the presence of nutrition channels, allowing oxygen and nutrient transportation through the structure, supplying internal bacterial cells (Davies 2003; Hall-Stoodley et al. 2012; Hickok 2018). Furthermore, biofilms can grow and adhere to biotic and abiotic surfaces, such as tissues and medical devices - including urinary catheters and heart valves. Since the biofilm structure protects bacteria from antibiotic and immune cells' actions, it increases biofilm cells' resistance, making it harder to eradicate during medical treatment (Davies 2003; Hall-Stoodley et al. 2012; Hickok 2018; Macedo and Abraham 2009; Yin et al. 2019).

Progressive chronic infections are commonly related to biofilms, especially found in nosocomial infections caused by biofilm-forming pathogenic bacteria (Schulze et al. 2021), such as *Staphylococcus aureus*. *S. aureus* is a Gram-positive pathogen frequently isolated from contaminated devices, able to cause bacteremia, skin and kidney abscesses, and lung, heart, and ocular inflammations, among other clinical conditions (Lister and Horswill 2014; Parastan et al. 2020). Furthermore, it is easily transmitted between individuals through direct contact in a hospital environment, representing a relevant clinical issue, especially due to methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) strains (Donlan 2001; Høiby 2014; Kong et al. 2018; Schulze et al. 2021).

An alternative approach to affecting bacterial biofilms is antivirulence therapy. Antivirulence compounds are defined as bioactive molecules that interfere with or inhibit virulence factors, including biofilm formation, which is associated with microorganisms'

pathogenicity (Fleitas Martínez et al. 2019; Silva et al. 2016). The advantages of this alternative include the ability to weaken the virulence strategies of the microorganisms, making them more susceptible to antibiotics and the immune system's actions. Additionally, this approach may not exert the same evolutionary pressure as broad-spectrum antibiotics that target essential cellular functions. These therapies may allow the microorganism to maintain its overall fitness and survival without triggering resistance mechanisms by specifically inhibiting virulence factors (Fleitas Martínez et al. 2019; Silva et al. 2016).

In this view, the oceans have been explored by scientists to search for molecules with new biological activity, including antibiofilm activity. Especially small molecules, such as marine peptides and small proteins, tend to display important roles in this regard (Borges and Simões 2019; Bhatnagar and Kim 2010; de Carvalho and Fernandes 2010; Venkatesan et al. 2017). In this context, sponge-associated marine bacteria seem to produce and release unique bioactive compounds, which provide benefits of nutrition, metabolism, and defense to the sponge (Anand et al. 2006; Thomas, Kavlekar, and LokaBharathi 2010). Bacteria from *Firmicutes* phylum represent around 15 to 50% of the isolated bacteria from sponges, and the *Priestia* genus (previously classified as *Bacillus*) has a high prevalence in this phylum and has been described as a producer of biomolecules with antimicrobial and antibiofilm activities (Anand et al. 2006; Bibi et al. 2020; Dat et al. 2021; Sayem et al. 2011). Herein, we characterize the antibiofilm activity of proteins from crude extract produced by a sponge associated *Priestia* sp. isolated from the Brazilian coast over *Staphylococcus aureus* strains.

2. Material and methods

2.1 Bacterial isolation and crude extract activity screening

2.1.1 Marine bacterial strain isolation

Initially, a collection of sponge-associated marine bacteria sampled from Ilha do Arvoredo biological reserve in Santa Catarina (SC), Brazil (27°S 16' 42.4"/48°W 22' 30.8") in November of 2007 was developed, as described by Trentin *et al.* (2011). From this bacterial collection, eight marine bacteria that had shown activity in the Trentin *et al.* (2011) study were selected. A new screening of bacterial-secreted molecules for bioactivity (as described in Section 2.1.3) was performed to evaluate the antibiofilm effect against pathogenic bacteria. The crude extract (also called Supernatant – Snt) of bacterium strain 208, isolated from marine sponge *Scopalina* sp., was the only strain that showed significant activity against *S. aureus* biofilm.

2.1.2 Bacterial strains

Marine bacteria were stocked in skim milk broth (Neogen, USA) and 10% glycerol at 4 °C until use (Trentin *et al.*, 2011). *Staphylococcus aureus* ATCC 25904 (strain Newman) was used as the main indicator of biofilm-producing pathogenic bacteria and stored in skim milk broth with 10% glycerol at 4 °C. *Staphylococcus aureus* ATCC 43300 (MRSA) was also tested in biological assays to confirm the activity against the resistant strain of *S. aureus*.

2.1.3 Culture conditions and biomolecules production

Marine bacteria 208 were grown on a commercial marine agar plate (BD Difco, Thermo Fisher Scientific, Sweden) and incubated at 30 °C for 24, 48, and 72 h. Bacterial growth colonies were suspended in saline suspension (0,9% NaCl) and inoculated in Difco Marine broth for 24 h at 28 °C in a shaker (150 rpm) for the metabolite production step. Next, the secreted molecules were separated from cells by centrifugation (1000 rpm, 4 °C for 40 min), and the supernatant was initially fractionated by ultrafilter Amicon Ultra-15 30 kDa (Millipore, USA) to select

molecules smaller than 30 kDa and concentrated by Amicon Ultra -15 10 kDa. Furthermore, the fractionated supernatant was filter-sterilised by 0.22 µm membrane pore (Minisart Sartorius Co, Göttingen, Germany) and used to assess antibiofilm activity against the pathogenic bacteria *Staphylococcus aureus* ATCC 25904. *S. aureus* was grown in Muller Hinton agar (Himedia, India) overnight at 37 °C for 18 h. Bacterial colonies were resuspended in saline suspension with a turbidity of 0.150 at optical density (OD) 600_{nm}, concentration to evolve the microbiological assays.

2.1.4 Biofilm measure

The crystal violet assay adapted from Trentin *et al* (2011) was used to evaluate the antibiofilm activity of molecules from bacteria 208. In this method, 80 µL of size-fractionated filtered supernatant from marine bacteria, 80 µL of bacterial saline suspension (*S. aureus*), and 40 µL of Brain Heart Infusion (BHI) broth (Oxoid, Thermo Fischer Scientific, USA) or Tryptic Soy Broth (TSB, Oxoid Ltd., England) supplemented with 1% glucose were added to a 96-well microtiter plates (Costar 3599, Corning Inc., USA) that was incubated at 37 °C for 24 h. Then, the plate wells were first washed three times with sterile saline to remove planktonic cells. Next, the plate was dried by incubating it at 60 °C for 1 h to heat-fix the formed biofilm, and the formed-biofilm was stained with 200 µL of 0.4% crystal violet for 15 minutes. The plates were washed with water, the remaining stains in wells were solubilized with 200 µL of absolute ethanol, and the OD of crystal violet suspension was measured at 570_{nm}, representing quantitative biofilm formation. The control condition was represented by a mixture of bacteria plus water in the plate well (instead of marine bacterial biomolecules), representing 100% biofilm formation. Bacteria treated with vancomycin (8 µg/mL) was used as non-forming biofilm control due to its antibiotic effect.

2.1.5 Production kinetics of bioactive compounds

Bacteria 208 were cultivated in Difco marine broth on a shaker (150 rpm) at 28 °C for different times: 0, 3, 6, 9, 12, 24 and 48 h. Culture growth was measured at each time point by collecting 200 µL from bacterial suspension and quantifying it by OD_{600nm}. Additionally, 50 mL of bacterial suspension from all seven time points were collected, centrifuged, and biomolecules from the supernatant were filtered by an ultrafilter Amicon centrifugal device (30,000 molecular weight cutoff). Bioactive molecules that passed through the filter pore were tested for the ability to inhibit biofilm, and this activity was expressed in biofilm quantification by OD_{570nm} against *S. aureus* (ATCC 25904).

2.2 Bacterial identification

2.2.1 Phylogenetic tree

Marine bacteria 208 was identified by *16S rRNA* gene sequence analysis using the BLAST tool (NCBI, Bethesda USA) search against the NCBI database (rRNA typestrains). Phylogeny reconstruction was accomplished by *16S rRNA*, evaluating highly similar sequences retrieved from the NCBI (GenBank), and subjected to multiple sequence alignment using MAFFT (Kato and Standley 2013). TRimm-AI (Capella-Gutiérrez, Silla-Martínez, and Gabaldón 2009) was utilised to eliminate poorly aligned positions and divergent regions in the aligned sequences. Subsequently, a Neighbor-Joining phylogenetic tree was performed using the Kimura two-parameter model for nucleotide substitution and applied 1000 bootstrap replicates. The entire phylogenetic analysis was conducted using the NGPhylogeny.fr server (Lemoine et al. 2019) and *Geobacillus stearothermophilus* and *Saccharococcus thermophilus* were used as an outgroup.

2.2.2 Whole-Genome Sequencing, Assembly, and Annotation

The genomic DNA of 208 was obtained using the Qiagen DNAeasy Plant kit®. Samples were prepared following the Illumina protocol, and whole-genome shotgun sequencing was conducted using the Illumina MiSeq platform. The raw fastq sequences were filtered using Scythe v0.994 and compared with the NCBI RefSeq genomes database using RefSeq Masher v0.1.2. The *Denovo* assembly was performed using the Unicyycle pipeline (Wick et al. 2017), and Whole Genome Shotgun project has been deposited at DDBJ/ENA/GenBank under the accession JAYIXA000000000 (NCBI BioProject accession: PRJNA1054655). The Genomic annotations were carried out using Prokka (Seemann 2014) and Rapid Annotations using Subsystems Technology (RAST) (Aziz et al. 2008). To generate the Cluster of Orthologous Groups (COG) function classification) and to identify sequences annotated by prokka as "*hypothetical protein*", eggNOG-mapper (eggnog-mapper.embl.de) was applied. For secondary metabolic analysis, the sequences were submitted to antiSMASH server (Blin et al. 2021).

2.3 Characterization of the bioactive compounds

2.3.1 Heat-shock assay and trypsin susceptibility of active molecules

To analyze the proteinaceous nature of active molecules, they were first exposed to a heat-shock test. The size-fractionated filtered supernatant produced by marine *Priestia* sp. was incubated at 120 °C for 15 min. Next, the antibiofilm activity was evaluated by biofilm mass quantification using the crystal violet protocol, as described above. Furthermore, the bioactive compounds were also incubated with trypsin enzyme to check their proteolytic degradation susceptibility. The supernatant was pre-treated with trypsin (20 µg/mL) for 2 h at 37°C and tested for its antibiofilm potency against *S. aureus* st. Newman (Abdhul et al. 2015).

2.3.2 Protein precipitation by ammonium sulfate

After a sequence of experiments, a 60% saturation of ammonium sulfate was used to precipitate proteins from 30 and 10 kDa size-fractionated supernatant (Duong-Ly and Gabelli 2014). Next, the sample was desalted by Pur-A-Lyzer Midi 6000 Dialysis Kit (Sigma, US) to eliminate salt interference. Finally, the protein concentration was estimated using the Pierce BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific, US) or by reading absorbance at 280_{nm} with NanoDrop 2000 (Thermo Fischer Scientific, US). Partially purified proteins from this point were called PPP.

2.3.3 Minimum Biofilm Inhibitory Concentration (MBIC) determination

The minimum biofilm inhibitory concentration (MBIC) was developed as described by Macià, Rojo-Molinero, and Oliver (2014) with modifications. Briefly, concentrations ranging from 16.0 µg/mL to 0.25 µg/mL of PPP were evaluated for biofilm inhibition in 96-well microtiter plates (Costar 3599, Corning, Inc., USA). 40 µL of BHI broth (Oxoid, Thermo Fisher Scientific, USA), 80 µL of *S. aureus* suspension, and 80 µL of PPP in deionised water were added to each well and then incubated at 37°C for 24 h to allow biofilm formation. Wells in the absence of bacteria were used as no biofilm controls, and wells without PPP were considered biofilm-forming controls. The biofilm was measured by crystal violet stain at OD_{570nm}. MBIC value was considered the lowest concentration of proteins that statistically inhibited biofilm formation.

2.3.4 Antibiotic assay using PPP upon S. aureus

The agar diffusion method was performed as described previously by the Clinical & Laboratory Standards Institute (CLSI, 2017) to evaluate antibiotic activity. Briefly, a bacterial suspension (*S. aureus*) in saline, with turbidity ranging from 0.8-1.0 at OD_{600nm}, a concentration

corresponding to the 0.5 McFarland scale, was prepared. Using a sterile swab, Muller Hinton (MH) agar (Himedia, India) was inoculated with the bacterial suspension to allow confluent growth over the plate. Three agar cuts (0.8 x 0.8 cm) were made per plate, and 50 µL of PPP at different concentrations (20.0, 4.0, and 2.0 µg/mL) were added to each cut and rested until agar absorbed all the suspension. The system was incubated at 37°C for 18 h, and halo formation was checked to evaluate the antibiotic activity of PPP. Vancomycin (8.0 µg/mL) was used as a positive control, and deionised water was used as a negative control for halo formation.

2.3.5 MTT and Colony Forming Units (CFU) assays

The viability of *S. aureus*-biofilm after incubation with PPP was analysed by MTT (3-[4,5-dimethyl-thiazol-2-yl]-2,5 - diphenyltetrazolium) as per the protocol adapted from Costa et al. (2018). The 96-well microtiter was assembled as described for MBIC assay, with 20.0, 4.0, or 2.0 µg/mL of PPP added. After 24 h of incubation at 37°C, the plate was washed 2 times with saline suspension, and 200 µL of MTT (0.3 mg/mL) was added to each well. It was incubated for 2 h at 37 °C in the dark. Next, 200 µL of dimethyl sulfoxide (DMSO) absolute was added to dissolve formazan deposits of purple color produced by metabolic active cells, and it was measured (OD_{570nm}) after 20 min incubation at room temperature.

Furthermore, a second assay was developed where the incubation of *S. aureus* and PPP in 96-well microtiter was repeated. However, in this case, the bacterial planktonic cells present in wells supernatant were collected and diluted four times with distilled water (10⁻³ to 10⁻⁶). Drops (10 µL) from different concentrations were spotted and absorbed in Muller-Hinton agar plates and incubated at 37 °C until grown bacterial colonies were observed. The counting of colony-forming units was performed.

2.3.6 Inhibition of early-stage adhesion

The initial biofilm formation step was evaluated to assess the PPP effect (at MBIC and 2x MBIC concentrations) over bacterial early-stage adhesion on the surface. A bacterial suspension (OD_{600nm} 0.150) was incubated with PPP in a centrifugal tube at 37 °C with agitation (180 rpm) until the microbial population duplicates. Next, the inoculum was added to a microtiter 96-well plate, and *S. aureus* formed-biofilm was quantified at 1, 2, 3, and 6 h of incubation (37 °C) by crystal violet stain protocol as previously described in Section 2.1.2.

2.4 Visualization of S. aureus biofilm in the presence of PPP

2.4.1 Optical microscopy

Biofilm from *S. aureus* was allowed to be formed over glass pieces (1 x 1 cm) in a 12-well cell culture plate (Greiner Bio-one, Frickenhausen, Germany) as an adapted protocol described by Sayem et al. (2011). The MBIC and 2x MBIC concentrations of PPP were added to a bacterial suspension (0.150 $OD_{600 nm}$) in BHI broth, and the plate was incubated for 24 h at 37 °C. After incubation, the wells were washed 3 times with saline suspension, and the crystal violet biofilm stain procedure was followed as described above. Stained glass pieces were observed by optical microscopy at 40x of magnitude (Zeiss Axiolab 5, Germany) and photographed (iPhone 7, Apple). Cultures without the addition of PPP were considered negative controls for biofilm formation.

2.4.2 Coated-surface analysis

Permanox™ slides (Nalge Nunc International, USA) were spin-coated with PPP (MBIC and 2x MBIC concentrations) in 70% aqueous acetone (Merk, Germany) by spin coater (Laurell Model WS-650MZ-23NPP/LITE) with 500 rpm for 5 sec and 5000 rpm over the next 40 s as described by Reis et al. (2020). Following this step, the Permanox was heat-fixed at 60°C for 2 h, sterilised with UV light, cut into pieces (10 x 25 mm²), washed with sterile saline suspension, and placed on individual wells in 96-well microplate as the final step. Biofilm from *S. aureus* was allowed to be formed over these pieces that were next prepared to be analysed in a JEOL JSM-6060 scanning electron microscope at 5 kV. Permanox coated with vehicle only (70% acetone) or without any coating were considered as biofilm growth controls.

2.5 Characterization of active proteins

2.5.1 Proteolytic activity assay

The proteolytic activity of PPP was assessed by using a protocol adapted from Ferrareze, Correa, and Brandelli (2016). Briefly, 100 µL of PPP (20 µg/mL) with 100 µL Tris-HCl pH 8.0 buffer and 100 µL of 1% (*m/v*) suspension of azocasein substrate (10 mg/mL) in 50 mM Tris-HCl pH 8.0 were mixed and incubated for 1 h at 37°C in shaker (180 rpm). The reaction was stopped by the addition of 500 µL TCA 30% (*v/v*). The tubes were centrifuged for 5 min at 10,000 rpm, and protease activity was quantified by substrate lysis expressed as arbitrary units (AU), considering 1 AU each 0.01 increase in absorbance (OD_{440nm}). The protein sample was replaced by a buffer in the negative control.

2.5.2 Influence of metals ions Zn^{2+} and Mg^{2+} and inhibitors

S. aureus cells plus 4.0 $\mu\text{g/mL}$ of PPP were incubated with 50 or 100 μM of metal ions (Zn^{2+} or Mg^{2+}) with or without 50 μM chelator (*ethylenediamine tetraacetic acid*, EDTA) to evaluate its influence over enzymatic activity. The metals, chelator, and bacterial suspension of *S. aureus* Newman were incubated for 24 h at 37 °C to allow biofilm growth in a 96-well plate. Biofilm was stained with crystal violet, and it was quantified by spectrophotometry ($OD_{570\text{ nm}}$). The control was considered the condition without metals and EDTA, representing 100% of biofilm formation.

Furthermore, PPP (20.0 $\mu\text{g/mL}$) was incubated with proteolytic inhibitors: tosyl-L-lysyl-chloromethane hydrochloride (TLCK) (1 mM), benzamidine hydrochloride (1 mM), iodoacetamide (1 mM) and 1,10 phenanthroline (1,10 PHEN) (10 mM) (Sigma, US) as described by Granato et al. (2015). The proteolytic activity was analysed with azocasein substrate cleavage and quantification expressed by $OD_{440\text{ nm}}$.

2.5.3 Chromatography, mass spectrometry analysis and Tricine-SDS-PAGE gel

PPP's compounds (574.5 μg) were separated by ionic exchange chromatography with HiTrap Q-Sepharose 5 mL column (GE Healthcare) connected to the AKTA start system (GE Healthcare). The column was equilibrated with 50 mM 2-[N-morpholino] ethanesulfonic acid (MES) pH 6.0 (buffer A), followed by elution with a linear gradient of 0 to 1 M sodium chloride (buffer B) at a flow rate of 1 mL/min. All the fractions were evaluated for antibiofilm activity as previously described. One active fraction was observed and submitted for mass spectrometry analysis.

The semi-purified fraction of PPP was digested as previously described by Beys-da-Silva et al. (2014). Approximately 20 μg of proteins determined using the BCA assay (Thermo

Scientific, IL) was suspended in digestion buffer (8 M urea, 100 mM Tris-HCl pH 8.5). Proteins were reduced with 5 mM tris-2-carboxyethyl-phosphine (TCEP) at room temperature for 20 min and alkylated with 10 mM iodoacetamide at room temperature in the dark for 15 min. After the addition of 1 mM CaCl₂ (final concentration), the proteins were digested with trypsin (Promega, Madison, WI) by incubation at 37 °C for 16 h. Proteolysis was stopped by adding formic acid to a final concentration of 5%. Samples were centrifuged at 14,000 rpm for 20 min, and the supernatant was collected. The resulting peptides eluted from the single-phase microcapillary column Acqua C18 reverse-phase (Phenomenex, Ventura, CA) were analysed in an LTQ-Orbitrap XL mass spectrometer (Thermo Finnigan) using a 120-min single-phase step separation. MS/MS spectra were extracted using RawXtract (version 1.9.9) and searched using PatternLab for Proteomics (Carvalho et al. 2016) against *Priestia megaterium* sequences available at NCBI Reference Sequence Database (downloaded on June 20, 2021), with a 0.01% of protein FDR. The sequences of peptides identified as "hypothetical proteins" were subject to search HMMER platform (Potter et al. 2018). Proteins showing sequence identities of more than 30% and an e-value 0.005 are referred to as close homologs to the respective peptide.

The protein band from fraction 24 was observed by 10% polyacrylamide Tris-Tricine gel as described by Schägger (2006). Electrophoresis was developed with a voltage of 100 V at room temperature, and proteins were stained with Coomassie Brilliant Blue (BioRad, USA).

2.6 Toxicity assays of PPP

2.6.1 *In vitro* hemolysis assay

The toxicity assays were performed as described by Loges et al. (2020). Briefly, human erythrocytes from venous blood of a volunteer (Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Ethics Committee under number 1.202.565) were collected in serum tubes and centrifuged at 1200 g for 10 minutes. The erythrocytes were washed 3 times with 10 mM phosphate buffer saline (pH 7.4/ 0.9% NaCl) and resuspended in the same buffer (1% suspension). The erythrocytes suspension (500 μ L) was incubated with 20 μ L of PPP (20, 8, or 4 μ g/mL) and 480 μ L of PBS for 1 h and 24 h at 37 °C. The hemoglobin content in lysed cells was measured by 540_{nm} absorbance. Positive control (hemolysis 100%) was represented by 1% Triton X-100 condition, and 10 mM phosphate buffered saline (PBS) buffer only was used as negative control (hemolysis 0%).

2.6.2 *In vivo* toxicity in *Galleria mellonella* larvae

For the toxicity assay in *in vivo* model, three groups of 10 *Galleria mellonella* larvae with weight between 220 – 270 mg were separated in three different conditions: (1) control, which larvae received 10 μ L PBS (10mM); (2) positive death control group received 10 μ L DMSO; (3) trial, which larvae had 10 μ L of PPP in PBS (50 mg/kg) injected by Hamilton glass syringe through its last proleg. All injected larvae were incubated at 30°C for 5 days and the survival was recorded each day following treatment.

2.7 Statistical analysis

Data were analysed with one-way ANOVA and Tukey's test to compare groups, including untreated control. The assays were performed at least in duplicate and $p < 0.05$ was considered statistically significant. The results were expressed as mean \pm standard deviation (SD). Statistical significance in *G. mellonella* survival analyses was determined by the log-rank

test. Statistical analyses were measured by the software GraphPad Prism version 8.0 (GraphPad Software, La Jolla California USA).

3. Results

3.1 Molecules from marine bacteria strain 208 with effect over *S. aureus* biofilm

The initial screening of secreted molecules from eight marine bacteria was performed and revealed strain 208 was a bacterium capable of producing active molecules (after 24, 48 and 72 h of culture) that were able to inhibit biofilm of *S. aureus* (Table S1) without killing bacterial cells in culture (Fig. 1a). Next, the Snt of strain 208 was first fractionated by a larger filter pore (30 kDa), followed by a smaller filter pore (10 kDa) filtration (Fig. 1b) to select smaller molecules. All three size fractions generated (\downarrow 30 kDa, 30-10 kDa, and \downarrow 10 kDa) were capable of inhibiting biofilm; however, molecules in 30 and 10 kDa sized fraction showed a higher antibiofilm activity (Fig. 1b). For this reason, we selected the 30-10 kDa-fraction for the following steps.

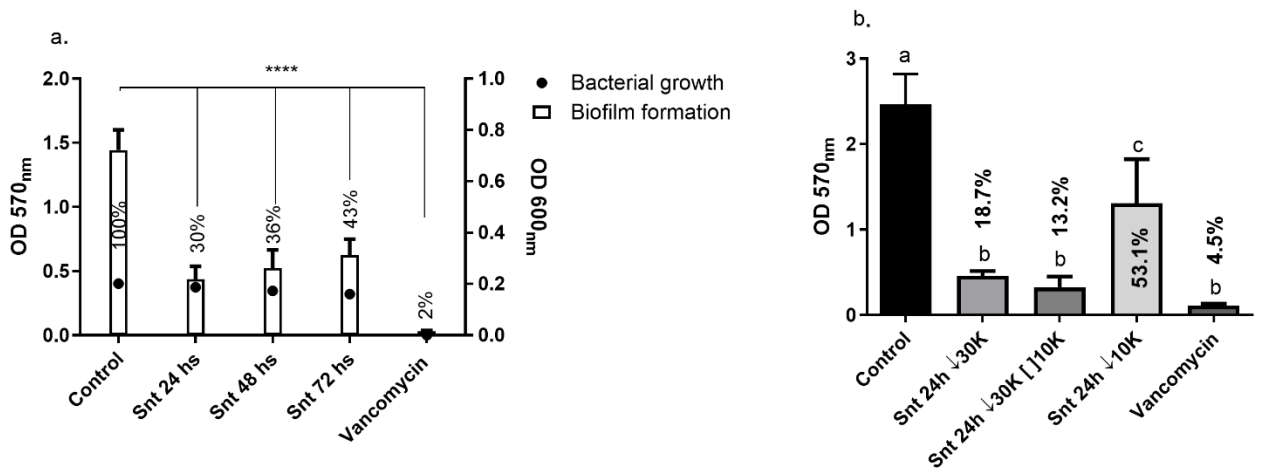


Fig. 1 Antibiofilm activity of supernatant (Snt) from strain 208 against *S. aureus* ATCC 25904 (strain Newman). (a) Strain 208 kinetic production of bioactive molecules upon *S. aureus* growth (OD 600_{nm}) and biofilm formation (OD 570_{nm}) after incubation for 24, 48, and 72 h. (b) Antibiofilm activity of the size-fractionated of the 24 hours-supernatant (most active) with 30 and 10 kDa ultrafilters (Amicon). The negative control was considered 100% of biofilm mass formation. Vancomycin (8 µg/mL) was used as a positive control for bacteria and biofilm growth. Data from three biological replicates are shown as mean ± SD. The asterisks and different letters represent statistical significance between control and different conditions (****p<0.0001 by *one-way* ANOVA with Tukey's multiple comparisons test).

3.2 Active molecules secreted by strain 208 are produced during the bacterial exponential growth phase.

To understand at which point the active molecules start to be released by strain 208 in the environment during growth times, the antibiofilm activity of fractionated supernatants was evaluated. Bacterial replication and the activity of secreted molecules were assessed at 0, 3, 9, 12, 24 and 48 h of culture. Strain 208 growth exhibited a typical exponential curve over time; meanwhile, active compounds able to inhibit *S. aureus* biofilm started to be released at 6 h growth time. However, secreted compounds after 9 h of culture led to the highest biofilm inhibition, which was maintained throughout the following hours (Fig. 2). These results showed that active molecules affecting *S. aureus* biofilm mass are secreted at the beginning of the bacteria exponential phase.

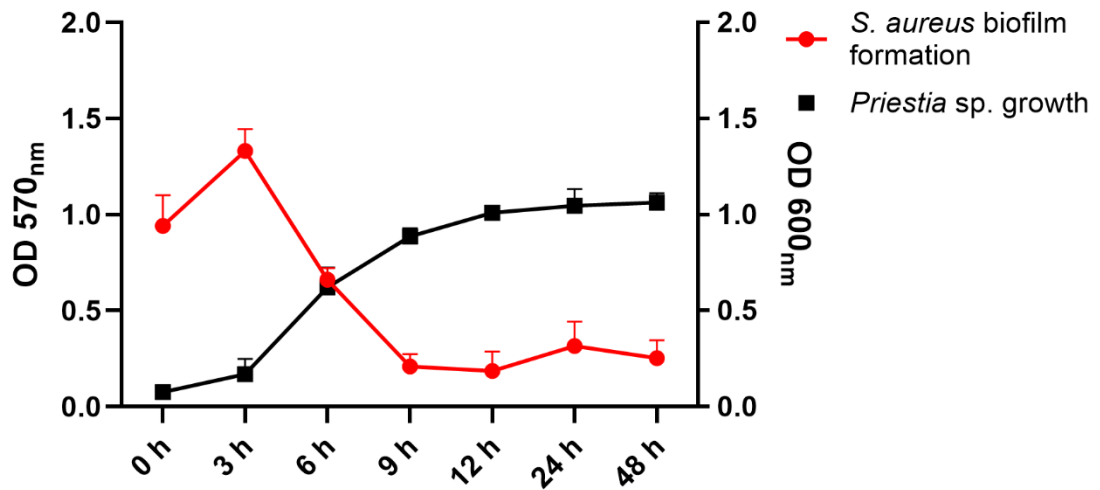


Fig. 2 Kinetics of bacterial growth and bioactive molecule production. Growth of strain 208 was measured from 0 h (initial microbial population) to 48 h of incubation in TSB medium (1% glucose) at 30°C in a shaker. The black line indicates the exponential growth of marine bacterial cells over time. The red line is related to quantified biofilm mass from *S. aureus* Newman by crystal violet method each time.

3.3 Marine bacteria 208 isolate identified as *Priestia* sp. by 16S rRNA gene sequence analysis and genome general features

The nucleotide sequence of the *16S rRNA gene* from the marine bacteria strain 208 was searched on the NCBI BLAST tool and found to be highly homologous with corresponding sequences from *Priestia* species. Phylogenetic analysis indicated that bacteria 208 is evolutionary closer to *P. aryabhatai* and *P. megaterium* species (Fig. 3).

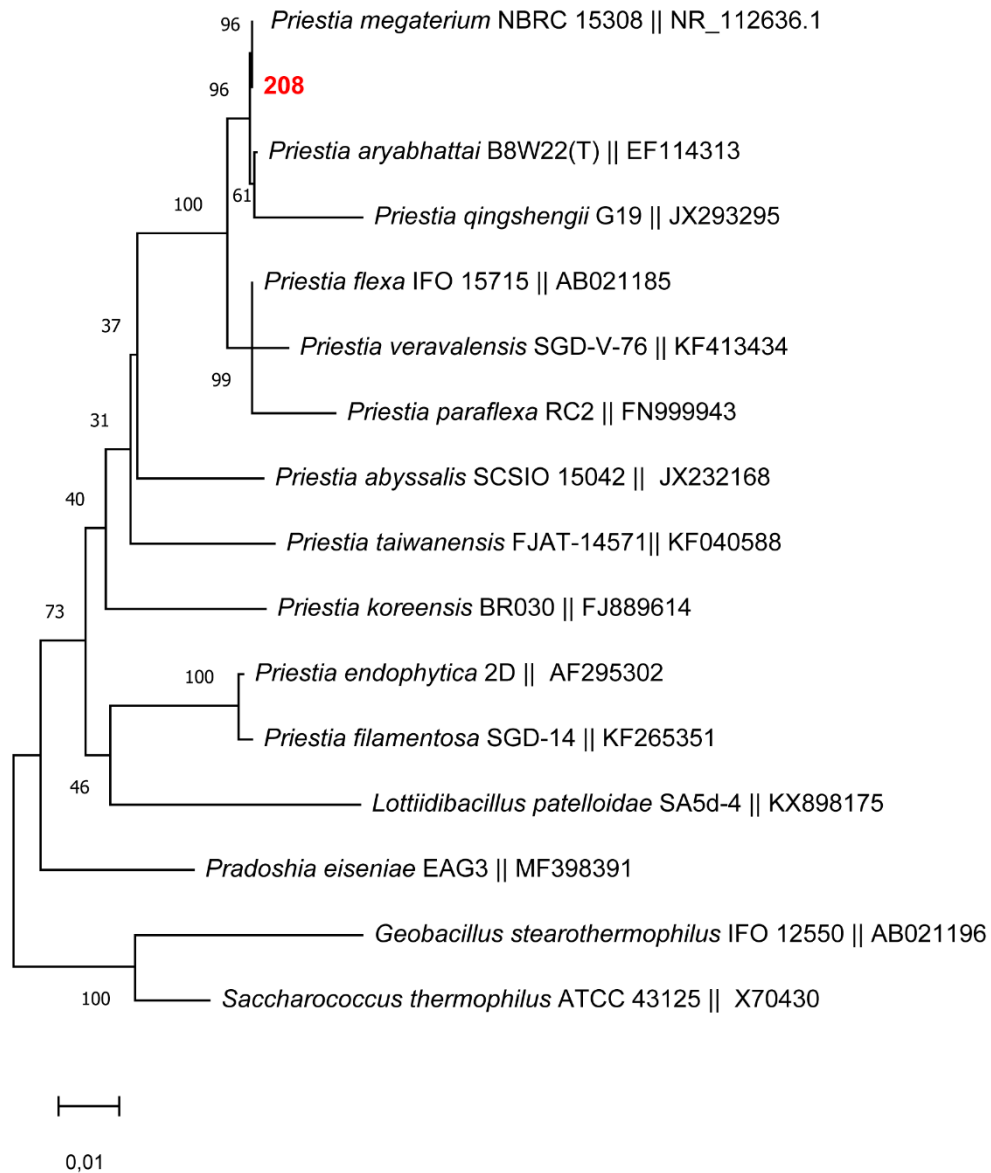


Fig. 3 Neighbour-joining phylogenetic tree based on 16S rRNA gene sequences. All the members of the genus *Priestia* were included in the analysis. *Geobacillus stearothermophilus* and *Saccharococcus thermophilus* were used as outgroups. Bootstrap values based on 1000 replications were calculated and expressed as percentages.

Genome analysis indicated the size of strain 208 is 5.3 Mb, which is closest in size to the median total length of *Priestia aryabhatai* species deposited to the NCBI database. The GC content is 37.91 mol%, and extrachromosomal elements are lacking. Annotation with Prokka predicted 5409 protein-coding genes and 84 tRNA genes. Functional analyses based on the

RAST database revealed that a majority of the protein-encoded sequences are involved in catabolic pathways of amino acids and their derivatives, carbohydrates, protein metabolism and vitamins, prosthetic groups, pigments, and poorly genes related to secondary metabolites (Fig. S1a). The number of genes belonging to the category "function unknown" was 1222, suggesting that further analysis in the genomics of the *Priestia* genus is necessary. A total of 4907 genes were matched in the COG database, belonging to 20 categories (Fig. S1b). Additionally, we checked the biosynthetic gene clusters (BCGs) for additional information since there is not much described information about the genome of *Priestia* members in the literature. AntiSMASH analysis suggested that the genome possesses 5 regions related to BCGs, primarily associated with terpenes. Further comparison with the gene sequences of other reference strains revealed that three regions are related to known compounds: surfactin, schizokines, and carotenoids (Table S2).

3.4 The bioactive compounds are proteins

To determine the nature of the antibiofilm molecules released by *Priestia* sp. in broth during culture, the crude extract was first exposed to high temperature (120°C). The supernatant lost its inhibitory activity after the heat shock treatment (Fig. 4a), indicating a proteinaceous origin. To pursue this idea, proteins were precipitated from a fractionated supernatant with 60% ammonium sulfate saturation and desalinated to continue the following experiments. At this point, the sample was called PPP (partially purified proteins). The proteinaceous nature of the bioactive compounds was confirmed by attenuation of PPP's activity after incubation with trypsin (Fig. 4b).

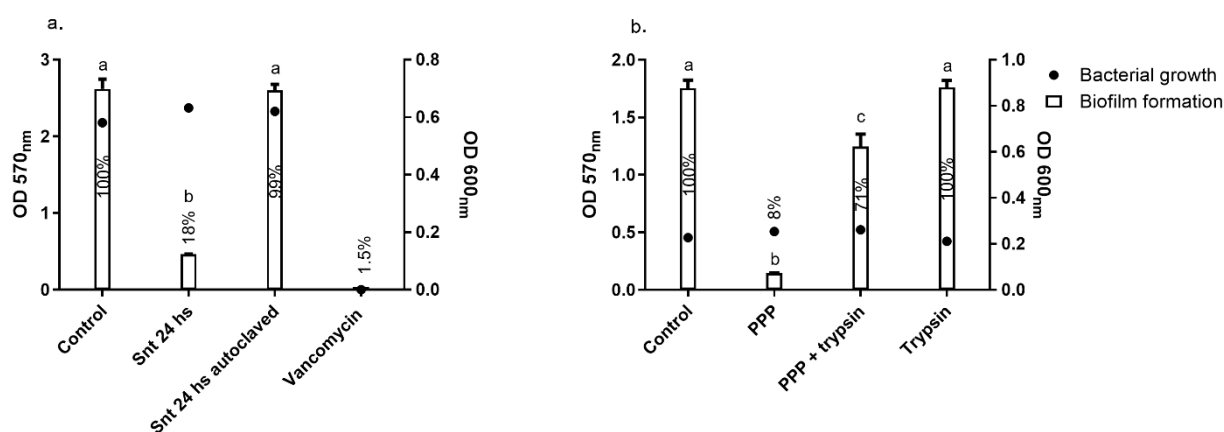


Fig. 4 Effect of heat shock and trypsin on compound activity. (a) Heat shock of 24-hours supernatant from *Priestia* sp. for 15 min at 120°C. (b) Precipitated partially purified proteins (PPP) were incubated with trypsin enzyme (20.0 µg/mL) for 2 h. The control with saline suspension incubated with *S. aureus* was considered 100% of biofilm formation. Vancomycin (8.0 µg/mL) was used as positive control, with no biofilm growth. Data from biological triplicates are shown as mean ± SD. Statistically significant differences between biofilm conditions were analysed by *one-way* ANOVA and *Tukey* post hoc test and indicated with different letters in graphic (P<0.0001).

3.5 Minimum biofilm inhibitory concentration (MBIC)

The minimum biofilm inhibitory concentration (MBIC) value was determined after different concentrations of PPP were incubated with *S. aureus* inoculum to allow biofilm growth. It was noted that the lowest concentration of 4.0 µg/mL significantly inhibited biofilm development from *S. aureus* Newman (Fig. 5) and the methicillin and oxacillin-resistant *S. aureus* 43300 (Fig. S2), indicating that it was the MBIC.

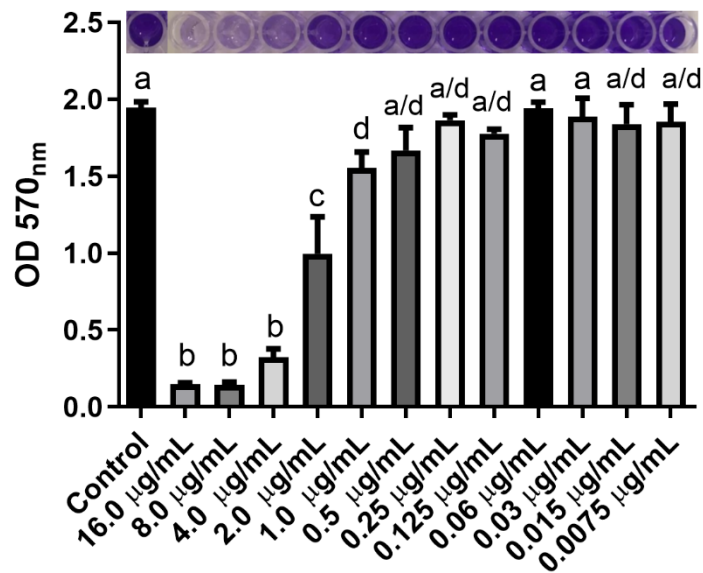


Fig. 5 Minimum Biofilm Inhibitory Concentration assay. Multiple concentrations of PPP (ranging from 16.0 µg/mL to 0.0075 µg/mL) were incubated with *S. aureus* Newman for 24 h at 37°C to allow biofilm development. Control was considered 100% of biofilm growth. Data are shown as mean ± SD from triplicate assays. Statistically significant differences between concentrations were indicated by different letters. $P < 0.001$ by *one-way* ANOVA test with *Tukey* post hoc test.

3.6 PPP affects only bacteria from biofilm, having no antibiotic outcome over planktonic bacteria

Agar diffusion was developed to verify the antimicrobial effects of PPP over *S. aureus* cells and it confirmed a non-antibiotic action (Fig. S3). Therefore, to confirm that PPP only interferes with the biofilm virulence factor without killing bacterial cells, MTT and colony-forming unit (CFU) assays were developed. MTT evaluated the viability of bacteria in biofilm after incubation with PPP by measuring bacterial metabolic activity and indeed, a decreased biofilm mass was detected in all tested PPP concentrations (20.0, 4.0, and 2.0 µg/mL) for Newman (Fig. 6a) and 43300 strains (Fig. S4). Although it was not statistically significant, CFU

showed a trend of increase in free-living cell concentration when *S. aureus* was incubated with PPP (Fig. 6b), in agreement with MTT outcome. Together, these results indicate that PPP avoids bacterial biofilm lifestyle, suggesting that active compounds affect the sessile structure and stimulate free bacterial lifestyle.

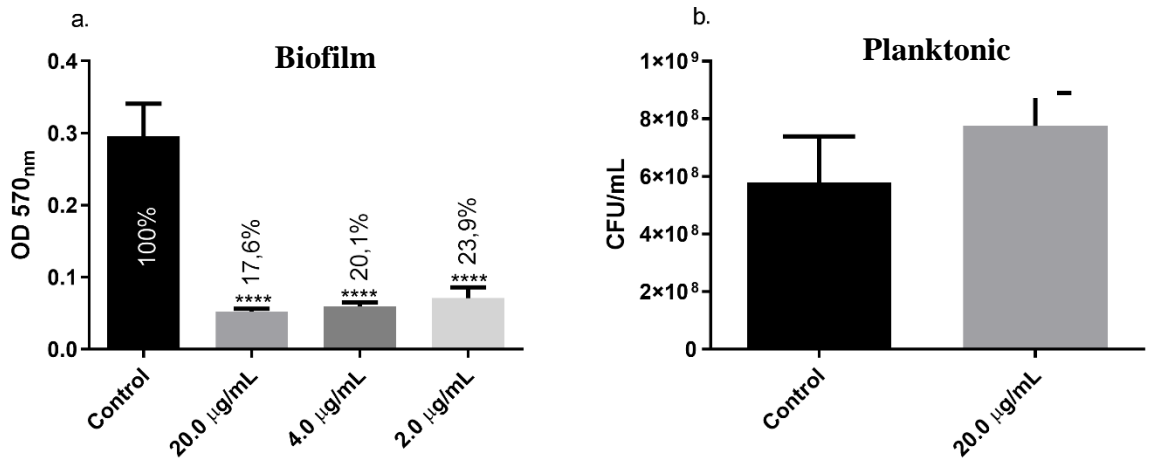


Fig. 6 Biofilm viability and Colony-Forming Unit bacteria from planktonic cells. *S. aureus* Newman OD_{600nm} 0.150 turbidity inoculum was incubated with BHI medium and 20.0 µg/mL PPP in 96 well plate at 37°C for 24 h. (a) MTT assay evaluated metabolic activity of *S. aureus* Newman in biofilm lifestyle when in the presence of PPP (20.0, 4.0, or 2.0 µg/mL); (b) Planktonic cells from the supernatant were incubated in Muller-Hinton plates to further count CFU. The error bars indicate the standard deviations of replicate tests. Asterisks represent statistically significant difference conditions (**** p<0,0001, one-way ANOVA test with Tukey post hoc test) and control was considered 100% of viability and cell growth.

3.7 Biofilm early-adhesion is impaired by PPP

To explore how PPP affects *S. aureus* biofilm development, the early steps of bacterial adhesion on a surface were observed. It has been shown that the presence of PPP at the beginning of the bacterial growth phase impairs biofilm development at an early step of this

process. Although the biofilm quantification was stable over time, it was lower when PPP was added compared to the control condition (Fig. 7).

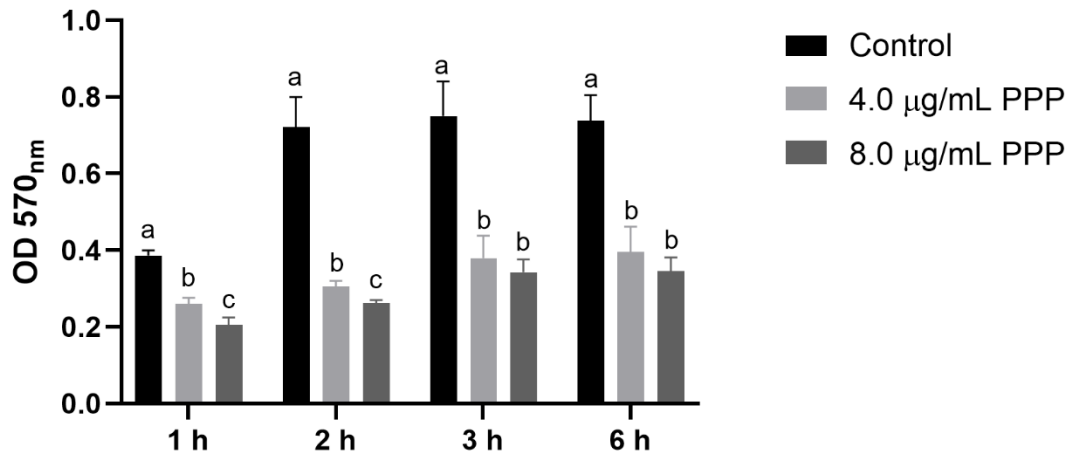


Fig. 7. PPP affects initial biofilm development. *S. aureus* Newman (OD_{600nm} 0.150) was incubated with PPP (4.0 and 8.0 µg/mL) in a shaker and following the inoculum, was allowed to grow in 96-well plate microtiter. Biofilm mass was quantified with crystal violet stain after 1, 2, 3, and 6 h incubation at 37 °C. The statistical differences between conditions are indicated by different letters in the graphic. The black bars represent the mean ±SD of biological triplicate assays analysed by *one-way* ANOVA and *Tukey's* multiple comparison post-test ($p < 0.0001$).

3.8 Microscopy analysis of PPP avoiding *S. aureus* biofilm development

Light microscopy showed a decrease in biofilm mass from *S. aureus* Newman (Fig. 8a, b, c) and 43300 (Fig. S5), evident at both lower and higher PPP concentrations (4.0 or 8.0 µg/mL).

A spin-coated assay was also performed, in which PPP (4.0 and 8.0 µg/mL) was used to recover a slice of Permanox that was then exposed to a bacterial inoculum suspension. The formed biofilm was analysed by SEM (Fig. 8 d, e, f, g). In this assay, only treatment with 8.0 µg/mL of PPP (Fig. 8g) interfered with biofilm formation, significantly decreasing the structure

compared to control without treatment (Fig. 8d) and vehicle control (Fig. 8e), while it was not observed for 4.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Fig. 8f).

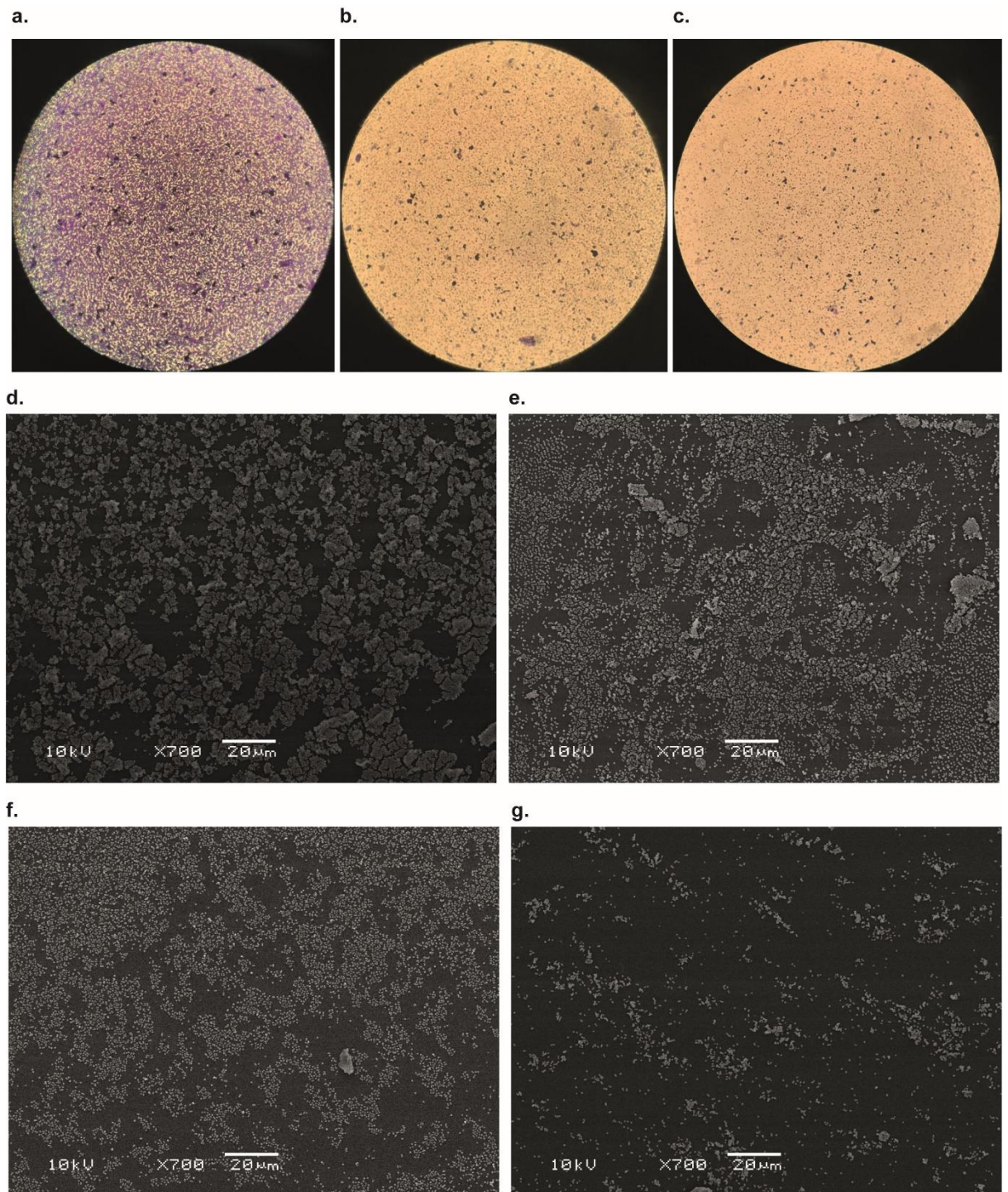


Fig. 8 Microscopy techniques to visualize biofilm inhibition. Light microscopy (a, b and c) showing reduced *S. aureus* Newman biofilm compared to control (a) when incubated with 4.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (b) and 8.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (c) of active PPP, grown over glass coverslip, stained with crystal violet, and observed with a microscope at 40x magnification.

SEM images of *S. aureus* Newman biofilm after Permanox slides had been recovered with PPP and incubated with a bacterial suspension for 24 h. Analysed conditions: biofilm control growth with non-treated permanox (d), acetone 70% vehicle control (e), 4.0 $\mu\text{g/mL}$ (f) and 8.0 $\mu\text{g/mL}$ (g). The white bar represents a 20 μm scale, and 700x of microscope magnification was employed. The white square represents images with 2500x magnification.

3.9 PPP did not present toxic effects in mammalian cells and in vivo by using *Galleria mellonella* larvae

Cytotoxicity of PPP to mammalian cells was investigated by testing its injury to human red blood cells with PPP concentrations of MBIC, 2x MBIC, and 5x MBIC. All conditions showed no hemolytic activity, similar to the saline control (Fig. 9). Triton X-100 was considered to cause 100% hemolysis and used as a positive control.

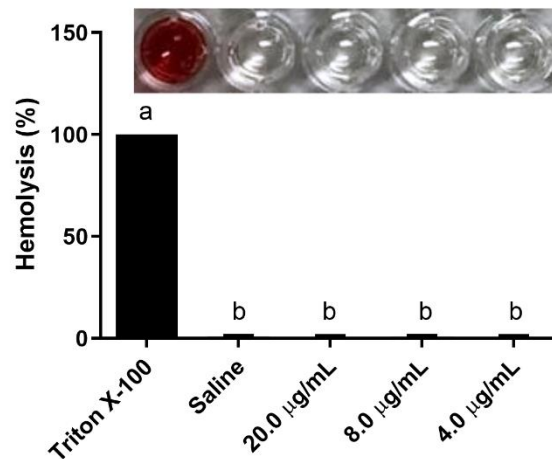


Fig. 9 Non-hemolytic activity of PPP. Treatment with Triton X-100 was used as positive control and represents 100% of erythrocyte hemolysis. The PPP toxicity was tested with concentrations of 20.0, 8.0, and 4.0 $\mu\text{g/mL}$. The error bars indicate the standard deviations of replicate tests and different letters indicate significant statistical differences between concentrations compared to control ($p < 0.0001$) analysed by *one-way* ANOVA and *Tukey's* multiple comparison post-test.

Furthermore, the *in vivo* toxicity analysis was also performed by using the *Galleria mellonella* model during five days of observation. One dose of 500 mg/kg of larvae weight was verified in groups of 10 individuals each. As a positive death control, 10 μ L of absolute DMSO was administered in a 10 larvae group, and 10 μ L of PBS was used as negative dead control. We observed that 100% of survival control (saline condition) and PPP-treated larvae survived, while DMSO (positive dead control) killed 50% of larvae on the first day and 100% were dead on the second day (Table 1).

Table 1: Toxicity effect of PPP in *G. mellonella* larvae

Groups	Larvae survival (%)				
	Day 1	Day 2	Day 3	Day 4	Day 5
PPP (50 mg/kg)	100	100	90	90	90
Dead control (10 μ L DMSO)	50	0	0	0	0
Survival control (10 μ L PBS)	100	100	100	100	100

3.10 Partially-purified proteins (PPP) biochemical characterization

3.10.1 Proteolytic activity assay and metal and chelator effect over enzymatic activity

Proteolytic activity from PPP was assessed by the azocasein method, as well as its sensibility to the presence of protease inhibitors, metals ions zinc and magnesium, or chelating agent. This proteolytic activity was confirmed by an amplified detection of dye molecules released from azocasein substrate hydrolysis (OD_{440nm}) when incubated with 20.0 μ g/mL of PPP, corresponding to 327 U/mL.h. Next, it was exposed to four different classes of protease inhibitors to evaluate its catalytic activity. The only inhibitor capable of acting upon PPP was

the 1,10 PHEN, a classical metallopeptidase inhibitor, reducing PPP activity to the level of the PBS control condition. It was found to be insensitive to trypsin, serine or cysteine residue inhibitors (Fig. 10).

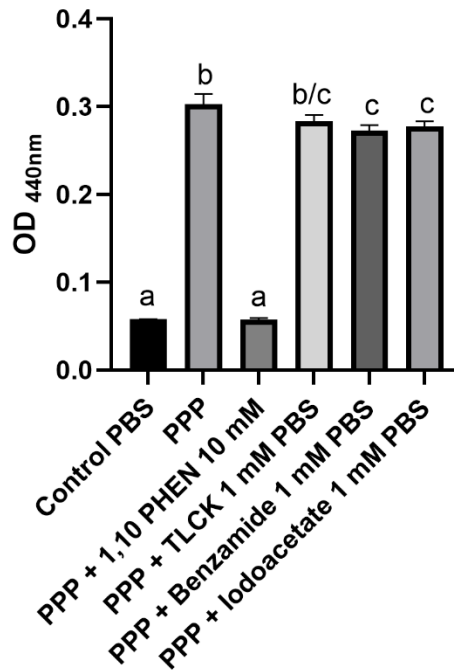


Fig. 10 Determination of proteolytic action from *Priestia* sp. PPP in co-incubation with proteolytic inhibitors. The protease activity of PPP was determined by the cleavage of azocasein substrate and the release of a colorful product in the medium measured by absorbance (440 nm). It was evaluated in the absence or presence of inhibitors, including 1,10 phenanthroline (10 mM), tosyl-L-lysyl-chloromethane hydrochloride (1mM), benzamide HCl (1 mM), and iodoacetate (1mM). The result was compared with PBS control without PPP, and different letters represent significant statistical differences between groups ($p < 0.0001$ by *one-way ANOVA*).

The addition of 50 μM Zn^{2+} or Mg^{2+} in *S. aureus* culture - without PPP incubation - was responsible for a slight increase in *S. aureus* biofilm growth, suggesting they may contribute to biofilm development. However, the presence of these metals did not influence the low biofilm amount when PPP was added, indicating that extra metal ions do not contribute to avoiding the inhibition effect of PPP over biofilm nor contribute to increased activity of PPP. Nevertheless, when 50 μM of EDTA chelator was added with bacteria plus PPP, the biofilm mass was restored

equal to the control condition, which indicates that metals are important to PPP action. Indeed, Zn^{2+} appears to be the most important metal cofactor, as it restored inhibition activity when an equal or higher concentration than EDTA (50 μM) was added, whereas Mg^{2+} did not. This suggests that the active proteins in PPP may have a higher affinity for Zn^{2+} than for the chelator (Fig. 11).

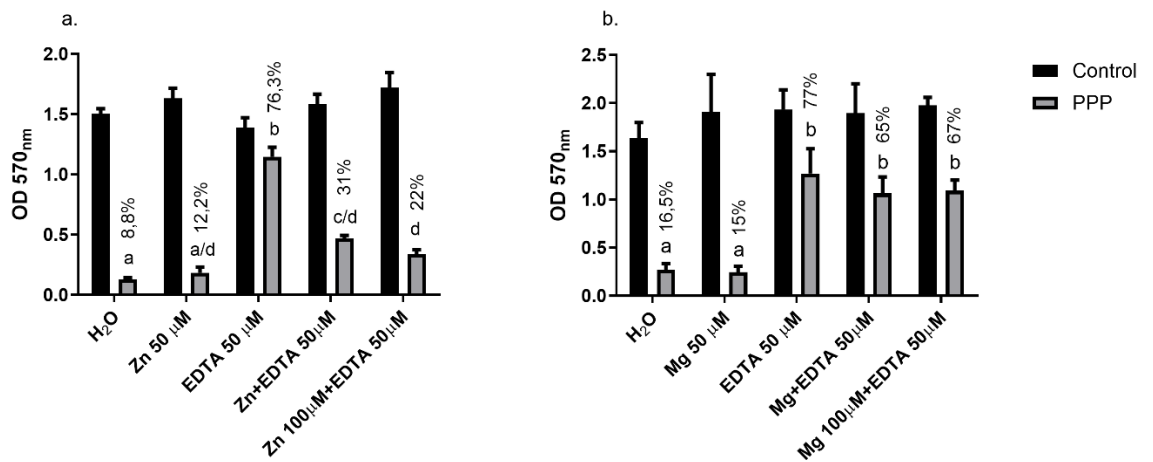


Fig. 11 Influence of metals and EDTA in PPP activity. *S. aureus* Newman biofilm was allowed to grow in the presence or absence of PPP, with or without Zn^{2+} and EDTA (a) and Mg^{2+} and EDTA (b). The statistical differences between conditions in which PPP was present (added metals or chelator) were highlighted by different letters in the graphic (same letter meaning no statistical difference, different letter meaning statistical difference). The black bars represent the mean \pm SD of biological triplicate assays analysed by *one-way* ANOVA and *Tukey's* multiple comparison post-test ($p < 0.0001$).

3.10.2 Ion-exchange chromatography and LC-MS/MS

Aiming to isolate the protein responsible for the activity, PPP was loaded at HiTrap Q-Sepharose anion-exchange column in AKTA. Sixty-three fractions of 1 mL each were collected (Fig. 12a), proteins were quantified and evaluated for biofilm inhibition effect. Fraction 24 showed significant activity inhibiting 93.6% biofilm mass with 12.0 $\mu g/mL$ protein fraction concentration (Fig. 12a). To confirm protein molecular mass, a tricine sodium

dodecyl sulfate-polyacrylamide gel (Tricine-SDS-PAGE 10%) was performed, and a band of approximately 47 kDa was visualised (Fig. 12b). Therefore, the chromatography was able to separate protein components of PPP, as the protein pattern in gel was visually reduced compared to pattern observed in gel with all PPP members (Fig. S6). Although the protein isolation goal was not achieved, fraction 24 was subjected to LC-MS/MS peptide mapping experiments, which identified a few proteins, including hypothetical proteins and a metalloprotease from the M28 peptidase family (Table S3).

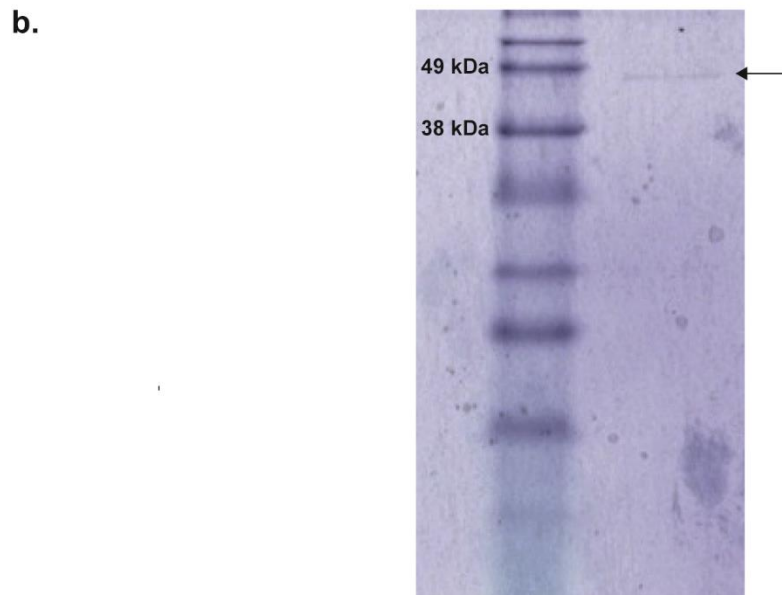
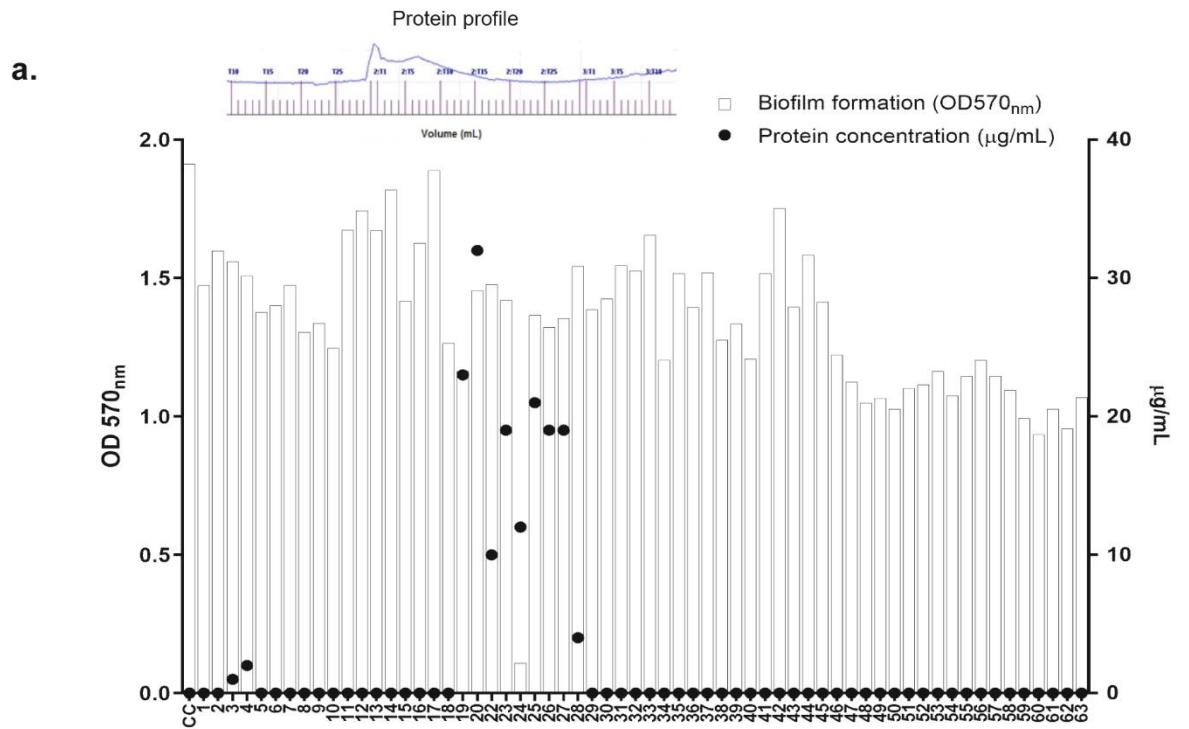


Figure 12 Partial purification of bioactive protein from PPP. (a) Biofilm mass quantification of *S. aureus* Newman after proteins secreted by *Priestia* sp. were eluted from an anion exchange chromatography column (574.3 µg of protein loaded onto a Q Sepharose column) with a linear gradient of 0-1M NaCl, along with the protein concentration of each fraction and the protein profile curve. (b) The active fraction (24) is indicated by a black arrow symbol in the Tricine SDS-PAGE to observe enzyme molecular mass.

The spectrometry analyses detected the presence of residues of metalloprotease belonging to the family Metalloprotease 28 (M28), which agreed with our genomic annotation that detected the presence of the *ywad* gene related to subfamily M28F. The *ywad* was first described in *Bacillus subtilis*, encoding double-zinc aminopeptidases (Fundoiano-Herscovitz et al. 2005). The genomics predictions also showed the presence of genes related to metalloprotease enzymes, including sequences related to the M20 and M32.

Discussion

The study identified strain 208, a sponge-associated marine bacterium capable of producing molecules that interfere with *S. aureus* biofilm formation, as *Priestia* sp. This genus was separated from the *Bacillus* genus following a reclassification of *Bacillus* species members based on common conserved regions of protein sequences (Gupta et al. 2020).

Genome sequencing analysis of *Priestia* sp. indicated a higher probability of proteins promoting this antibiofilm effect, as the number of clustered protein-coding genes with known functions, determined by similarity cluster analysis, exceeded the number of BCGs responsible for encoding secondary metabolites (Kiesewalter et al. 2021; Xia et al. 2022). Although secondary metabolites are commonly associated with antibiotics and other bioactivities, the literature describes *Bacillus* species releasing proteins in culture media, such as proteases, with biological activity (Chen et al. 2016; Kunst et al. 1997; Liu et al. 2022).

The hypothesis that the active molecule was a protein was confirmed by all enzymatic assays and mass spectrometry identification, revealing that the most abundant identified peptide present in chromatography active fraction was a peptidase from the M28 family (Table S3). This finding was also consistent with genome analysis, which identified the *ywad* gene coding

for a peptidase from the M28 family. Members of family M28 are commonly described as leucyl aminopeptidases and play important roles in therapeutic and biotechnological applications (Lemke and Vilcinskas 2020; Nandan and Nampoothiri 2020; Wang et al. 2023) and have been associated with controlling biofilm formation (Zhao et al. 2018). Moreover, this family comprises metallopeptidases whose catalytic activity requires two zinc ions at the catalytic site for enzymatic action (Gao et al. 2014; Hecht et al. 2013).

Literature has previously described the *ywad* gene from *B. subtilis* coding for an aminopeptidase from the M28A subfamily called BSAP (Fundoiano-Hershcovitz et al. 2005). The study demonstrated that BSAP has two zinc spots in the catalytic site required for proteolytic activity and it was inhibited by the presence of EDTA and 1,10 phenanthroline, which is consistent with our findings. Additionally, disruption of *S. aureus* biofilm by an extracellular zinc-dependent metallopeptidase was described by Papa et al. (2013). Although this protease was produced by the Gram-negative bacteria *Serratia marcescens* (Papa et al. 2013), this result aligns with our findings, indicating the importance of Zn^{2+} in PPP antibiofilm activity against *S. aureus* biofilm.

There are various known mechanisms to disrupt pathogen biofilms, including affecting extracellular polymeric substances matrix development, promoting mature biofilm dispersal, and interfering with bacteria communication (*quorum sensing*), metabolism, and cell division (Blackman et al. 2021; Koo et al. 2017; Roy et al. 2018). In this context, Papa *et. al* (2013) and other studies have hypothesised that aminopeptidases can interact with microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules (MSCRAMM) such as *S. aureus* adhesins, reducing initial adhesion and affecting biofilm establishment (Elchinger et al. 2014; Shukla and Rao 2017). This theory is consistent with our findings as well, as we demonstrated that partially purified proteins (PPP) significantly affected the initial formation phase of biofilm, impairing early-stage adhesion to the surface (Fig. 7). However, further studies are needed to confirm the

mechanism of action of PPP. Although we were unable to purify the active protein, we found that the PPP secreted by *Priestia* sp. constituted a heterogeneous group of proteins, including molecules larger than 30 kDa as observed on SDS-PAGE gel (Fig. 12b). While our experimental design aimed to select only molecules smaller than 30 kDa, it is well known that the ability of proteins to pass through a membrane pore with defined size depends on various parameters, such as membrane surface hydrodynamics, centrifugal force pressure, membrane resistance, porosity, and hydrophobicity, as well as protein interactions considering protein shape (globular or non-globular), charge, and solvent dilution (Cui 2005; Erickson 2009; Schratte 2004). Thus, these variable factors may explain the range of different sizes of proteins found in PPP (Fig. S6).

Regardless of protein sizes, PPP's biofilm inhibition activity was effective against both tested *S. aureus* strains (Newman and 43300), corresponding to 83.4% and 80.1% of biofilm inhibition, respectively, demonstrating effectiveness against the *S. aureus* species irrespective of acquired resistant mechanisms, considering that 43300 is a multidrug-resistant strain (MRSA). Furthermore, it is noteworthy that isolation steps, including size-filtration and protein precipitation, usually result in a loss of active compound amount while increasing its specific activity, as noted in studies purifying secreted proteins from *Priestia* or *Bacillus* spp. (Badoei-Dalfard, Karami, and Ravan 2015; Ramachandran et al. 2014; Yu et al. 2019). This may explain why PPP from *Priestia* sp. in the present study exhibited increased inhibition compared to its initial crude extract, from 70% (crude extract) to 86.8% after ultrafiltration and finally 92% (after protein precipitation) of biofilm suppression. The minimum biofilm inhibitory concentration (MBIC) value of PPP was considered low (4.0 µg/mL) with high activity.

Furthermore, light microscopy confirmed the ability of MBIC concentration to disrupt the biofilm of *S. aureus* Newman and 43300 strains. Meanwhile, 2x MBIC concentration was required to effectively inhibit biofilm on spin-coating assay. This higher concentration of PPP

to coat the surface was likely due to its methodology design. In this case, molecules are incorporated into a substrate by fast speed spin, promoting a thin-coated surface; however, its effectiveness depends on coating speed, coated molecule size, and molecule-surface interaction, for example (Butt and A. 2022). Regardless, the efficiency of our assay aligns with previous reports that have also demonstrated the success of surface-coated metabolites from *Priestia* and *Bacillus* in inhibiting biofilm formation by various microorganisms (Ceresa et al. 2016; Chopra et al. 2015; Sayem et al. 2011). Finally, although PPP impairs biofilm structure, it is not able to kill bacterial free-living cells, as well as it was non-cytotoxic *in vitro* and *in vivo*, indicating an absence of toxic effects (Table 1).

Conclusion

Partially purified proteins synthesised by *Priestia* sp., a marine sponge-associated bacterium, containing metallopeptidase as a component, interfere with *S. aureus* biofilm development, possibly by preventing initial bacterial adhesion to surfaces. The metallopeptidase from the M28 family was identified as a major active component of PPP, although further studies are required to confirm its role definitively. Ultimately, our findings demonstrate the biotechnological potential application of biomolecules, particularly proteins, from marine bacteria, contributing to the field of antivirulence therapy research.

References

- Abdhul, K., M. Ganesh, S. Shanmughapriya, S. Vanithamani, M. Kanagavel, K. Anbarasu, and K. Natarajaseenivasan. (2015). "Bacteriocinogenic potential of a probiotic strain *Bacillus coagulans* [BDU3] from Ngari." *Int J Biol Macromol* 79: 800-6. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2015.06.005>.
- Anand, T. P., A. W. Bhat, Y. S. Shouche, U. Roy, J. Siddharth, and S. P. Sarma. (2006). "Antimicrobial activity of marine bacteria associated with sponges from the waters off the coast of South East India." *Microbiol Res* 161 (3): 252-62. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2005.09.002>.
- Aziz, R. K., D. Bartels, A. A. Best, M. DeJongh, T. Disz, R. A. Edwards, K. Formsma, S. Gerdes, E. M. Glass, M. Kubal, F. Meyer, G. J. Olsen, R. Olson, A. L. Osterman, R. A. Overbeek, L. K. McNeil, D. Paarmann, T. Paczian, B. Parrello, G. D. Pusch, C. Reich, R. Stevens, O. Vassieva, V. Vonstein, A. Wilke, and O. Zagnitko. (2008). "The RAST Server: rapid annotations using subsystems technology." *BMC Genomics* 9: 75. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-9-75>.
- Badoei-Dalfard, A., Z. Karami, and H. Ravan. (2015). "Purification and characterization of a thermo- and organic solvent-tolerant alkaline protease from *Bacillus* sp. JER02." *Prep Biochem Biotechnol* 45 (2): 128-43. <https://doi.org/10.1080/10826068.2014.907176>.
- Beys-da-Silva, W. O., L. Santi, M. Berger, D. Calzolari, D. O. Passos, J. A. Guimarães, J. J. Moresco, and J. R. Yates. (2014). "Secretome of the biocontrol agent *Metarhizium anisopliae* induced by the cuticle of the cotton pest *Dysdercus peruvianus* reveals new insights into infection." *J Proteome Res* 13 (5): 2282-96. <https://doi.org/10.1021/pr401204y>.
- Bhatnagar, I., and S. K. Kim. (2010). "Immense essence of excellence: marine microbial bioactive compounds." *Mar Drugs* 8 (10): 2673-701. <https://doi.org/10.3390/md8102673>.
- Bibi, F., M. Yasir, A. Al-Sofyani, M. I. Naseer, and E. I. Azhar. (2020). "Antimicrobial activity of bacteria from marine sponge." *Saudi J Biol Sci* 27 (4): 1139-1147. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2020.02.002>.
- Blackman, L. D., Y. Qu, P. Cass, and K. E. S. Locock. (2021). "Approaches for the inhibition and elimination of microbial biofilms using macromolecular agents." *Chem Soc Rev* 50 (3): 1587-1616. <https://doi.org/10.1039/d0cs00986e>.
- Blin, K., S. Shaw, A. M. Kloosterman, Z. Charlop-Powers, G. P. van Wezel, M. H. Medema, and T. Weber. (2021). "antiSMASH 6.0: improving cluster detection and comparison capabilities." *Nucleic Acids Res* 49 (W1): W29-W35. <https://doi.org/10.1093/nar/gkab335>.
- Borges, A., and M. Simões. (2019). "Quorum Sensing Inhibition by Marine Bacteria." *Mar Drugs* 17 (7). <https://doi.org/10.3390/md17070427>.
- Butt, and Muhammad A. (2022). "Thin-Film Coating Methods: A Successful Marriage of High-Quality and Cost-Effectiveness—A Brief Exploration." *Coatings* 12, no. 8: 1115. <https://doi.org/10.3390/coatings12081115>.
- Capella-Gutiérrez, S., J. M. Silla-Martínez, and T. Gabaldón. (2009). "trimAl: a tool for automated alignment trimming in large-scale phylogenetic analyses." *Bioinformatics* 25 (15): 1972-3. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp348>.
- Carvalho, P. C., D. B. Lima, F. V. Leprevost, M. D. Santos, J. S. Fischer, P. F. Aquino, J. J. Moresco, J. R. Yates, and V. C. Barbosa. (2016). "Integrated analysis of shotgun proteomic data with PatternLab for proteomics 4.0." *Nat Protoc* 11 (1): 102-17. <https://doi.org/10.1038/nprot.2015.133>.

- Ceresa, C., M. Rinaldi, V. Chiono, I. Carmagnola, G. Allegrone, and L. Fracchia. (2016). "Lipopeptides from *Bacillus subtilis* AC7 inhibit adhesion and biofilm formation of *Candida albicans* on silicone." *Antonie Van Leeuwenhoek* 109 (10): 1375-88. <https://doi.org/10.1007/s10482-016-0736-z>.
- Chen, J., L. Zhao, G. Fu, W. Zhou, Y. Sun, P. Zheng, J. Sun, and D. Zhang. (2016). "A novel strategy for protein production using non-classical secretion pathway in *Bacillus subtilis*." *Microb Cell Fact* 15: 69. <https://doi.org/10.1186/s12934-016-0469-8>.
- Chopra, L., G. Singh, K. Kumar Jena, and D. K. Sahoo. (2015). "Sonorensin: A new bacteriocin with potential of an anti-biofilm agent and a food biopreservative." *Sci Rep* 5: 13412. <https://doi.org/10.1038/srep13412>.
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) (2017). Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests. 12th Edition, Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.
- Costa, G. A., F. C. P. Rossatto, A. W. Medeiros, A. P. F. Correa, A. Brandelli, A. P. G. Frazzon, and A. S. D. Motta. (2018). "Evaluation antibacterial and antibiofilm activity of the antimicrobial peptide P34 against *Staphylococcus aureus* and *Enterococcus faecalis*." *An Acad Bras Cienc* 90 (1): 73-84. <https://doi.org/10.1590/0001-3765201820160131>.
- Cui, Zhanfeng. (2005). "Protein separation using ultrafiltration — an example of multi-scale complex systems." *China Particuology* 3 (6): 343-348. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S1672-2515\(07\)60213-9](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S1672-2515(07)60213-9).
- Dat, T. T. H., N. T. K. Cuc, P. V. Cuong, H. Smidt, and D. Sipkema. (2021). "Diversity and Antimicrobial Activity of Vietnamese Sponge-Associated Bacteria." *Mar Drugs* 19 (7). <https://doi.org/10.3390/md19070353>.
- Davies, D. (2003). "Understanding biofilm resistance to antibacterial agents." *Nat Rev Drug Discov* 2 (2): 114-22. <https://doi.org/10.1038/nrd1008>.
- de Carvalho, C. C., and P. Fernandes. (2010). "Production of metabolites as bacterial responses to the marine environment." *Mar Drugs* 8 (3): 705-27. <https://doi.org/10.3390/md8030705>.
- Donlan, R. M. (2001). "Biofilms and device-associated infections." *Emerg Infect Dis* 7 (2): 277-81. <https://doi.org/10.3201/eid0702.010226>.
- Duong-Ly, K. C., and S. B. Gabelli. (2014). "Salting out of proteins using ammonium sulfate precipitation." *Methods Enzymol* 541: 85-94. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-420119-4.00007-0>.
- Elchinger, P. H., C. Delattre, S. Faure, O. Roy, S. Badel, T. Bernardi, C. Taillefumier, and P. Michaud. (2014). "Effect of proteases against biofilms of *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*." *Lett Appl Microbiol* 59 (5): 507-13. <https://doi.org/10.1111/lam.12305>.
- Erickson, H. P. (2009). "Size and shape of protein molecules at the nanometer level determined by sedimentation, gel filtration, and electron microscopy." *Biol Proced Online* 11: 32-51. <https://doi.org/10.1007/s12575-009-9008-x>.
- Ferrareze, P. A. G., Correa, A. P. F. C., Brandelli, A. (2016). Purification and characterization of a keratinolytic protease produced by probiotic *Bacillus subtilis*. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology* 7: 102-109. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2016.05.009>
- Fleitas Martínez, O., M. H. Cardoso, S. M. Ribeiro, and O. L. Franco. (2019). "Recent Advances in Anti-virulence Therapeutic Strategies With a Focus on Dismantling Bacterial Membrane Microdomains, Toxin Neutralization, Quorum-Sensing Interference and Biofilm Inhibition." *Front Cell Infect Microbiol* 9: 74. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2019.00074>.
- Fundoiano-Hershcovitz, Y., L. Rabinovitch, S. Shulami, V. Reiland, G. Shoham, and Y. Shoham. (2005). "The ywad gene from *Bacillus subtilis* encodes a double-zinc

- aminopeptidase." *FEMS Microbiol Lett* 243 (1): 157-63. <https://doi.org/10.1016/j.femsle.2004.12.001>.
- Gao, X., Z. Liu, W. Cui, L. Zhou, Y. Tian, and Z. Zhou. (2014). "Enhanced thermal stability and hydrolytic ability of *Bacillus subtilis* aminopeptidase by removing the thermal sensitive domain in the non-catalytic region." *PLoS One* 9 (3): e92357. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0092357>.
- Granato, M. Q., P. A. Massapust, S. Rozental, C. S. Alviano, A. L. dos Santos, and L. F. Kneipp. (2015). "1,10-phenanthroline inhibits the metallopeptidase secreted by *Phialophora verrucosa* and modulates its growth, morphology and differentiation." *Mycopathologia* 179 (3-4): 231-42. <https://doi.org/10.1007/s11046-014-9832-7>.
- Gupta, R. S., S. Patel, N. Saini, and S. Chen. (2020). "Robust demarcation of 17 distinct *Bacillus* species clades, proposed as novel Bacillaceae genera, by phylogenomics and comparative genomic analyses: description of *Robertmurraya kyonggiensis* sp. nov. and proposal for an emended genus *Bacillus* limiting it only to the members of the Subtilis and Cereus clades of species." *Int J Syst Evol Microbiol* 70 (11): 5753-5798. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.004475>.
- Hall-Stoodley, L., P. Stoodley, S. Kathju, N. Høiby, C. Moser, J. W. Costerton, A. Moter, and T. Bjarnsholt. (2012). "Towards diagnostic guidelines for biofilm-associated infections." *FEMS Immunol Med Microbiol* 65 (2): 127-45. <https://doi.org/10.1111/j.1574-695X.2012.00968.x>.
- Hecht, K. A., V. A. Wytiaz, T. Ast, M. Schuldiner, and J. L. Brodsky. (2013). "Characterization of an M28 metalloprotease family member residing in the yeast vacuole." *FEMS Yeast Res* 13 (5): 471-84. <https://doi.org/10.1111/1567-1364.12050>.
- Hickok, N. J. (2018). "What are Biofilms?" *Spine (Phila Pa 1976)* 43 (7): S7-S8. <https://doi.org/10.1097/BRS.0000000000002548>.
- Høiby, N. (2014). "A personal history of research on microbial biofilms and biofilm infections." *Pathog Dis* 70 (3): 205-11. <https://doi.org/10.1111/2049-632X.12165>.
- Katoh, K., and D. M. Standley. (2013). "MAFFT multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability." *Mol Biol Evol* 30 (4): 772-80. <https://doi.org/10.1093/molbev/mst010>.
- Kiesewalter, H. T., C. N. Lozano-Andrade, M. Wibowo, M. L. Strube, G. Maróti, D. Snyder, T. S. Jørgensen, T. O. Larsen, V. S. Cooper, T. Weber, and ÁT Kovács. (2021). "Genomic and Chemical Diversity of *Bacillus subtilis* Secondary Metabolites against Plant Pathogenic Fungi." *mSystems* 6 (1). <https://doi.org/10.1128/mSystems.00770-20>.
- Kong, C., C. F. Chee, K. Richter, N. Thomas, N. Abd Rahman, and S. Nathan. (2018). "Suppression of *Staphylococcus aureus* biofilm formation and virulence by a benzimidazole derivative, UM-C162." *Sci Rep* 8 (1): 2758. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-21141-2>.
- Koo, H., R. N. Allan, R. P. Howlin, P. Stoodley, and L. Hall-Stoodley. (2017). "Targeting microbial biofilms: current and prospective therapeutic strategies." *Nat Rev Microbiol* 15 (12): 740-755. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2017.99>.
- Kunst, F., N. Ogasawara, I. Moszer, A. M. Albertini, G. Alloni, V. Azevedo, M. G. Bertero, P. Bessières, A. Bolotin, S. Borchert, R. Borriss, L. Boursier, A. Brans, M. Braun, S. C. Brignell, S. Bron, S. Brouillet, C. V. Bruschi, B. Caldwell, V. Capuano, N. M. Carter, S. K. Choi, J. J. Cordani, I. F. Connerton, N. J. Cummings, R. A. Daniel, F. Denziot, K. M. Devine, A. Düsterhöft, S. D. Ehrlich, P. T. Emmerson, K. D. Entian, J. Errington, C. Fabret, E. Ferrari, D. Foulger, C. Fritz, M. Fujita, Y. Fujita, S. Fuma, A. Galizzi, N. Galleron, S. Y. Ghim, P. Glaser, A. Goffeau, E. J. Golightly, G. Grandi, G. Guiseppi, B. J. Guy, K. Haga, J. Haiech, C. R. Harwood, A. Hénaut, H. Hilbert, S. Holsappel, S. Hosono, M. F. Hullo, M. Itaya, L. Jones, B. Joris, D. Karamata, Y. Kasahara, M. Klaerr-

- Blanchard, C. Klein, Y. Kobayashi, P. Koetter, G. Koningstein, S. Krogh, M. Kumano, K. Kurita, A. Lapidus, S. Lardinois, J. Lauber, V. Lazarevic, S. M. Lee, A. Levine, H. Liu, S. Masuda, C. Mauël, C. Médigue, N. Medina, R. P. Mellado, M. Mizuno, D. Moestl, S. Nakai, M. Noback, D. Noone, M. O'Reilly, K. Ogawa, A. Ogiwara, B. Oudega, S. H. Park, V. Parro, T. M. Pohl, D. Portelle, S. Porwollik, A. M. Prescott, E. Presecan, P. Pujic, B. Purnelle, G. Rapoport, M. Rey, S. Reynolds, M. Rieger, C. Rivolta, E. Rocha, B. Roche, M. Rose, Y. Sadaie, T. Sato, E. Scanlan, S. Schleich, R. Schroeter, F. Scoffone, J. Sekiguchi, A. Sekowska, S. J. Seror, P. Serror, B. S. Shin, B. Soldo, A. Sorokin, E. Tacconi, T. Takagi, H. Takahashi, K. Takemaru, M. Takeuchi, A. Tamakoshi, T. Tanaka, P. Terpstra, A. Togoni, V. Tosato, S. Uchiyama, M. Vandebol, F. Vannier, A. Vassarotti, A. Viari, R. Wambutt, H. Wedler, T. Weitzenegger, P. Winters, A. Wipat, H. Yamamoto, K. Yamane, K. Yasumoto, K. Yata, K. Yoshida, H. F. Yoshikawa, E. Zumstein, H. Yoshikawa, and A. Danchin. (1997). "The complete genome sequence of the gram-positive bacterium *Bacillus subtilis*." *Nature* 390 (6657): 249-56. <https://doi.org/10.1038/36786>.
- Lemke, S., and A. Vilcinskis. (2020). "European Medicinal Leeches-New Roles in Modern Medicine." *Biomedicines* 8 (5). <https://doi.org/10.3390/biomedicines8050099>.
- Lemoine, F., D. Correia, V. Lefort, O. Doppelt-Azeroual, F. Mareuil, S. Cohen-Boulakia, and O. Gascuel. (2019). "NGPhylogeny.fr: new generation phylogenetic services for non-specialists." *Nucleic Acids Res* 47 (W1): W260-W265. <https://doi.org/10.1093/nar/gkz303>.
- Lister, J. L., and A. R. Horswill. (2014). "*Staphylococcus aureus* biofilms: recent developments in biofilm dispersal." *Front Cell Infect Microbiol* 4: 178. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2014.00178>.
- Liu, Y., J. Fu, L. Wang, Z. Zhao, H. Wang, S. Han, X. Sun, and C. Pan. (2022). "Isolation, identification, and whole-genome sequencing of high-yield protease bacteria from Daqu of ZhangGong Laojiu." *PLoS One* 17 (4): e0264677. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0264677>.
- Loges, L. A., D. B. Silva, G. V. B. Paulino, M. F. Landell, and A. J. Macedo. (2020). "Polyketides from marine-derived *Aspergillus welwitschiae* inhibit *Staphylococcus aureus* virulence factors and potentiate vancomycin antibacterial activity in vivo." *Microb Pathog* 143: 104066. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2020.104066>.
- Macedo, A. J., and W. R. Abraham. (2009). "Can infectious biofilm be controlled by blocking bacterial communication?" *Med Chem* 5 (6): 517-28.
- Macià, M. D., E. Rojo-Molinero, and A. Oliver. (2014). "Antimicrobial susceptibility testing in biofilm-growing bacteria." *Clin Microbiol Infect* 20 (10): 981-90. <https://doi.org/10.1111/1469-0691.12651>.
- Nandan, A., and K. M. Nampoothiri. (2020). "Therapeutic and biotechnological applications of substrate specific microbial aminopeptidases." *Appl Microbiol Biotechnol* 104 (12): 5243-5257. <https://doi.org/10.1007/s00253-020-10641-9>.
- Papa, R., M. Artini, A. Cellini, M. Tilotta, E. Galano, P. Pucci, A. Amoresano, and L. Selan. (2013). "A new anti-infective strategy to reduce the spreading of antibiotic resistance by the action on adhesion-mediated virulence factors in *Staphylococcus aureus*." *Microb Pathog* 63: 44-53. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2013.05.003>.
- Parastan, R., M. Kargar, K. Solhjoo, and F. Kafilzadeh. (2020). "A synergistic association between adhesion-related genes and multidrug resistance patterns of *Staphylococcus aureus* isolates from different patients and healthy individuals." *J Glob Antimicrob Resist* 22: 379-385. <https://doi.org/10.1016/j.jgar.2020.02.025>.

- Potter, S. C., A. Luciani, S. R. Eddy, Y. Park, R. Lopez, and R. D. Finn. 2018. "HMMER web server: (2018) update." *Nucleic Acids Res* 46 (W1): W200-W204. <https://doi.org/10.1093/nar/gky448>.
- Ramachandran, R., A. G. Chalasani, R. Lal, and U. Roy. (2014). "A broad-spectrum antimicrobial activity of *Bacillus subtilis* RLID 12.1." *ScientificWorldJournal* 2014: 968487. <https://doi.org/10.1155/2014/968487>.
- Reis, S. V. D., N. S. Ribeiro, D. A. Rocha, I. S. Fortes, D. D. S. Trentin, S. F. Andrade, and A. J. Macedo. (2020). "Antibacterial and antibiofilm activities of a disubstituted quinazoline compound against *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*." *Chem Biol Drug Des* 96 (6): 1372-1379. <https://doi.org/10.1111/cbdd.13745>.
- Roy, R., M. Tiwari, G. Donelli, and V. Tiwari. (2018). "Strategies for combating bacterial biofilms: A focus on anti-biofilm agents and their mechanisms of action." *Virulence* 9 (1): 522-554. <https://doi.org/10.1080/21505594.2017.1313372>.
- Sayem, S. M., E. Manzo, L. Ciavatta, A. Tramice, A. Cordone, A. Zanfardino, M. De Felice, and M. Varcamonti. (2011). "Anti-biofilm activity of an exopolysaccharide from a sponge-associated strain of *Bacillus licheniformis*." *Microb Cell Fact* 10: 74. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-10-74>.
- Schratter, P. (2004). "Purification and concentration by ultrafiltration." *Methods Mol Biol* 244: 101-16. <https://doi.org/10.1385/1-59259-655-x:101>.
- Schulze, A., F. Mitterer, J. P. Pombo, and S. Schild. (2021). "Biofilms by bacterial human pathogens: Clinical relevance - development, composition and regulation - therapeutical strategies." *Microb Cell* 8 (2): 28-56. <https://doi.org/10.15698/mic2021.02.741>.
- Schägger, H. (2006). "Tricine-SDS-PAGE." *Nat Protoc* 1 (1): 16-22. <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.4>.
- Seemann, T. (2014). "Prokka: rapid prokaryotic genome annotation." *Bioinformatics* 30 (14): 2068-9. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu153>.
- Shukla, S. K., and T. S. Rao. (2017). "*Staphylococcus aureus* biofilm removal by targeting biofilm-associated extracellular proteins." *Indian J Med Res* 146 (Supplement): S1-S8. https://doi.org/10.4103/ijmr.IJMR_410_15.
- Silva, L. N., K. R. Zimmer, A. J. Macedo, and D. S. Trentin. (2016). "Plant Natural Products Targeting Bacterial Virulence Factors." *Chem Rev* 116 (16): 9162-236. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.6b00184>.
- Thomas, T. R., D. P. Kavlekar, and P. A. LokaBharathi. (2010). "Marine drugs from sponge-microbe association--a review." *Mar Drugs* 8 (4): 1417-68. <https://doi.org/10.3390/md8041417>.
- Trentin, D. S., D. F. Gorziza, W. R. Abraham, A. L. Antunes, C. Lerner, B. Mothes, C. Termignoni, and A. J. Macedo. (2011). "Antibiofilm activity of *Cobetia marina* filtrate upon *Staphylococcus epidermidis* catheter-related isolates." *Braz J Microbiol* 42 (4): 1329-33. <https://doi.org/10.1590/S1517-838220110004000013>.
- Venkatesan, J., S. Anil, S. K. Kim, and M. S. Shim. (2017). "Marine Fish Proteins and Peptides for Cosmeceuticals: A Review." *Mar Drugs* 15 (5). <https://doi.org/10.3390/md15050143>.
- Wang, Y., P. Zhao, Y. Zhou, X. Hu, and H. Xiong. (2023). "From bitter to delicious: properties and uses of microbial aminopeptidases." *World J Microbiol Biotechnol* 39 (3): 72. <https://doi.org/10.1007/s11274-022-03501-3>.
- Wick, R. R., L. M. Judd, C. L. Gorrie, and K. E. Holt. (2017). "Unicycler: Resolving bacterial genome assemblies from short and long sequencing reads." *PLoS Comput Biol* 13 (6): e1005595. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1005595>.

- Xia, L., Y. Miao, A. Cao, Y. Liu, Z. Liu, X. Sun, Y. Xue, Z. Xu, W. Xun, Q. Shen, N. Zhang, and R. Zhang. (2022). "Biosynthetic gene cluster profiling predicts the positive association between antagonism and phylogeny in *Bacillus*." *Nat Commun* 13 (1): 1023. <https://doi.org/10.1038/s41467-022-28668-z>.
- Yin, W., Y. Wang, L. Liu, and J. He. (2019). "Biofilms: The Microbial "Protective Clothing" in Extreme Environments." *Int J Mol Sci* 20 (14). <https://doi.org/10.3390/ijms20143423>.
- Yu, P., X. Wang, X. Huang, Q. Ren, and T. Yan. (2019). "Purification and characterization of a propanol-tolerant neutral protease from." *Prep Biochem Biotechnol* 49 (7): 718-726. <https://doi.org/10.1080/10826068.2019.1605526>.
- Zhao, T., Y. Zhang, H. Wu, D. Wang, Y. Chen, M. J. Zhu, and L. Z. Ma. (2018). "Extracellular aminopeptidase modulates biofilm development of *Pseudomonas aeruginosa* by affecting matrix exopolysaccharide and bacterial cell death." *Environ Microbiol Rep* 10 (5): 583-593. <https://doi.org/10.1111/1758-2229.12682>.

Statements and Declaration

Acknowledgments/Funding: This work was supported by CAPES (88887.130212/2017-01), FAPERGS-PRONEM (1871-25511/13-4), MCTI/CNPq (3141395/2016-8, 03353/2016-3, 312351/2017-8478489/2013-7 and 408578/2013-0) and Universal/CNPq (443150/2014-1 and 425970/2018-3) and FAPERGS - CTEG - Cluster Tecnológico Gaúcho de Edição Gênica. We appreciate the technical assistance given by CME/UFRGS in scanning electron microscopy and we thank Viviane Nunes da Silva Anselmo for technical support.

Competing interest: The authors have no relevant financial or non-financial interests to disclose.

Author contribution statement: Nicole Sartori Ribeiro conceived of or designed study, performed research, analysed data, contributed new methods or models and wrote the paper. Deisiane Fernanda da Rosa performed research, analysed data, contributed new methods or models and wrote the paper. Marina Amaral Xavier and Sharon Vieira dos Reis conceived of or designed study and contributed new methods or models. Walter Beys-da-Silva and Lucélia Santi contributed new methods or models and wrote the paper. Cristiano Valim Bizarro, Pedro Ferrari Dalberto and Luiz Augusto Basso analysed data. Alexandre José Macedo

conceived of or designed study, performed research, contributed new methods or models, administrated the project and acquired the funding. All authors read and approved the final manuscript.

Supplementary Material

Tables

Table S1 Screening for antibiotic and antibiofilm activities of 10 kDa fractionated-crude extracts from marine bacteria against *Staphylococcus aureus* cells and biofilm.

Bacteria strain	Genus (% similarity)	Effect over <i>S. aureus</i> (%inhibition)
202	Non-identified	Antibiotic (38%)
208	<i>Priestia</i> sp. (99%)	Inhibition of biofilm (70%)
210	Non-identified	NA
256	<i>Bacillus</i> . spp (100%)	NA
266	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> (98,6%)	Antibiotic (44%)
BMPV 26	Non-identified	NA
BMPV 40	<i>Vibrio alginolyticus</i> (99%)	NA
BMPV Mel	<i>Bacillus stratosphericus</i> (92%)	NA

NA: non-active

Table S2 Identified secondary metabolite regions by Antismash server. The Antismash Protocluster Types (T3PKS:Type III Polyketide synthase; NI-siderophore: NRPS-independent; IucA/IucC-like siderophores (siderophore prior to 7.0)).

Region	Type	From	To	Most similar known cluster	Similarity
Region 12.1	Terpene	150,054	171,922	ND	ND
Region 12.2	T3PKS	851,343	892,428	ND	ND
Region 14.1	Terpene	885,377	906,195	surfactin	13%
Region 14.2	NI-siderophore	1,071,317	1,087,892	schizokinen	50%
Region 18.1	Terpene	20,544	41,392	carotenoid	50%

Table S3 Main identified proteins from searched *Priestia megaterium* sequences available at NCBI Reference Sequence Database

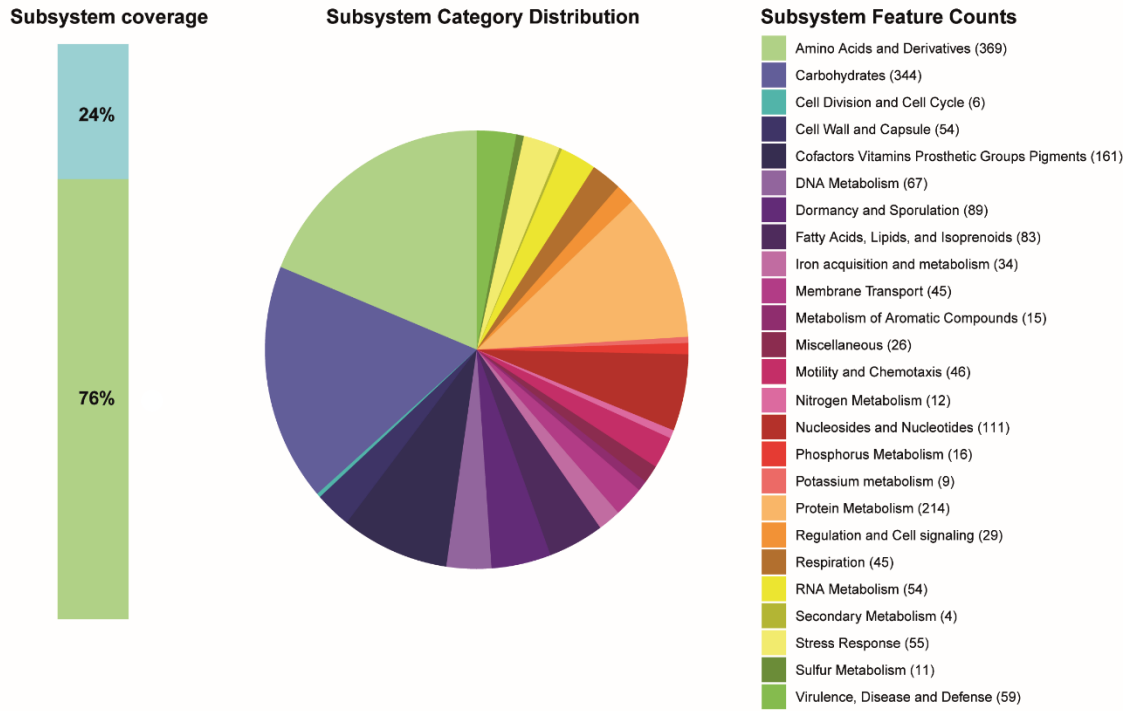
Peptide Sequence	Spectrum Count	Description
DVAEIVGTAIYDR	18	<i>M28 family peptidase</i>
NISLSIIVLGAFILFCSFSFGFTGAIY	13	<i>Hypothetical protein</i>
NQQTEVEFIKEENKISFPDCSVLLK	9	<i>Hypothetical protein</i>
TGTLTPYFSHPGIK	6	<i>Endonuclease</i>
VSDGTAVLGLGNIGPEAALSVMEGKAVLFK	6	<i>NAD-dependent malic enzyme</i>
SEVIGMMSSEAFNLSVSNDMAGFIE	6	<i>Carboxypeptidase M32</i>
ELLASIHAIKSDLRIVGGDLVEVAP	6	<i>Agmatinase</i>
QLLQQNKVAAIVTLPKGFSDIAHG	5	<i>ABC transporter permease</i>
EYLLLLIFAGFIILSIMLQWMK	5	<i>Hypothetical protein</i>
NEIYNAAVKGEVPR	5	<i>YjgB family protein</i>
TNALIAGDSFQVQGGVAVSGQLKPLFPFP	5	<i>MBL fold metallo-hydrolase</i>
EERLEHPAAILDNMLDWAAENNRIAE	5	<i>UDP-glucose--hexose-1- phosphate uridylyltransferase</i>

Spectrum Count: total counted number of spectra identified peptide or protein.

Description: identified corelated protein

Figures

a.



b.

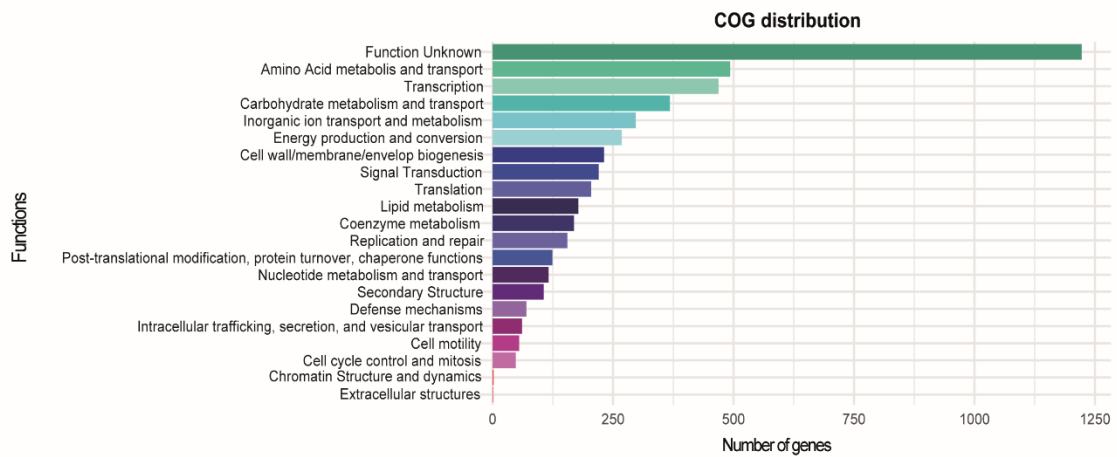


Fig. S1 *Priestia* sp. genetic features. (a). Distribution of major protein-coding genes by RAST Server. The pie chart represents the number of proteins annotated to each subsystem category. The bar indicates subsystem coverage: the blue bar region is the percentage of proteins that could be annotated by RAST and the green bar represents the proteins that were not annotated. (b) COG categories distribution, showing number of predicted genes annotated in each category.

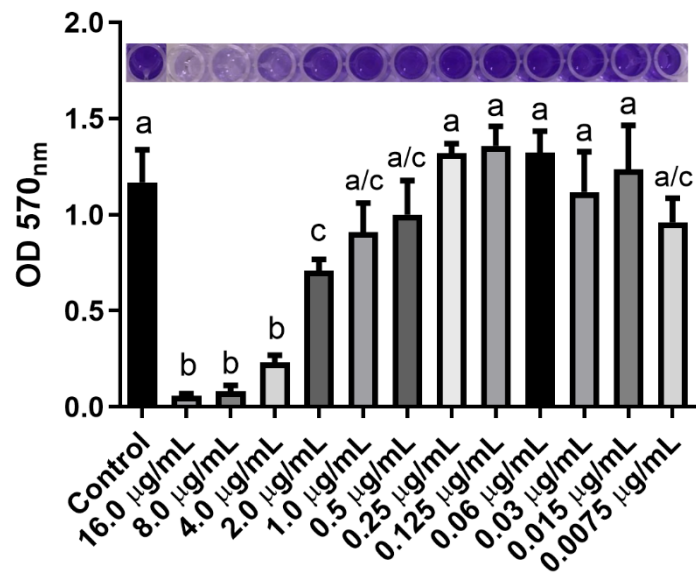
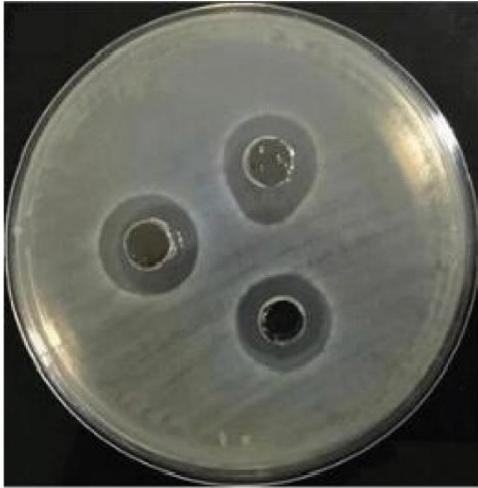


Fig. S2 Minimum Biofilm Inhibitory Concentration Assay of PPP over *S. aureus* 43300 biofilm. Different concentrations of PPP (ranging from 16.0 µg/mL to 0.0075 µg/mL) were incubated with *S. aureus* 43300 inoculum for 24 h at 37°C to allow biofilm development in 96 well plates microplate. The biofilm was revealed by crystal violet method, and quantification was measured by optical density (OD) at 570_{nm} using spectrophotometry. The control was considered 100% of biofilm growth. Data are presented as mean ± SD from triplicate assays. Statistically significant differences between concentrations were indicated by different letters. P<0.001 by *one-way* ANOVA test with *Tukey* post hoc test.

a.



b.



Figure S3 Antibiotic assay. Agar-diffusion test to evaluate antimicrobial action of PPP produced by *Priestia* sp. against *S. aureus* Newman. Bacterial inoculum was determined by OD_{600} of 0.08-0.1, and it was inoculated onto Muller-Hinton plates. 8.0 $\mu\text{g/mL}$ of vancomycin (a) or 20.0 $\mu\text{g/mL}$ of PPP (b) was added in three place spots to allow interaction with microorganisms. The plates were incubated at 37°C for 24 h. The antibiotic represented positive halo control.

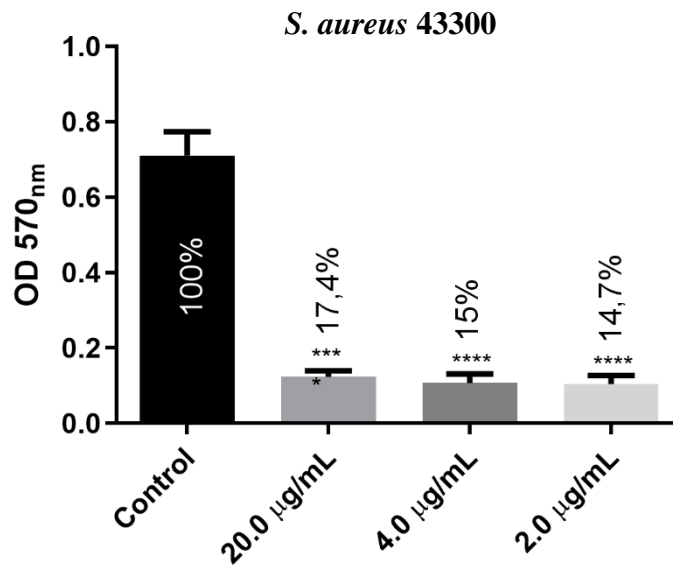


Figure S4 Bacterial biofilm viability. *S. aureus* 43300 (MRSA) active metabolism in biofilm was assessed by MTT assay when incubated with PPP (20.0, 4.0 or 2.0 µg/mL). The error bars indicate the standard deviations of replicate tests. Asterisks represent statistically significant differences (**** $p < 0.0001$, *One-way* ANOVA with *Tukey's* post-test analysis), and control was considered 100% of cells viability.

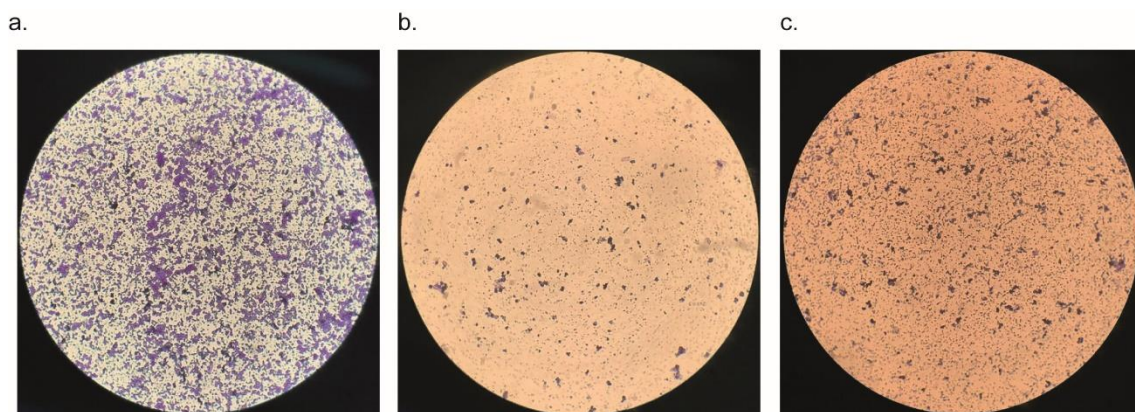


Figure S5 Light microscopy of *S. aureus* 43300 biofilm. Microscopy technique (a, b and c) showing the biofilm formation of *S. aureus* 43300 biofilm with or without PPP coincubation (a) at 4.0 µg/mL (b) and 8.0 µg/mL (c). Bacteria were grown for 24 h on a glass coverlip, stained with crystal violet, and observed under a microscope at a magnification of 40x.

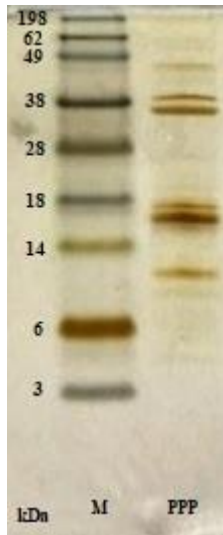


Figure S6 Tricine SDS-PAGE gel of PPP. Silver stained SDS-PAGE of PPP, Lane-M: protein marker; lane-PPP: 1mg/mL of PPP.

O presente trabalho teve como objetivo identificar o potencial bioativo de metabólitos produzidos por bactérias associadas às esponjas marinhas, coletadas na costa brasileira, destacando sua capacidade em inibir a formação de biofilme de bactérias patogênicas, utilizando como modelos *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* e *Pseudomonas aeruginosa*. Essas bactérias são espécies fortes formadoras de biofilme com uma importância clínica evidente, já que estão comumente correlacionadas com infecções nosocomiais e resistentes (SANTAJIT; INDRAWATTANA, 2016).

A resistência bacteriana é atualmente uma questão de saúde pública, na qual um grande número de bactérias patogênicas, que apresentam diversos fatores de virulência, tem desenvolvido mecanismos de resistência devido, especialmente, ao uso incorreto e indiscriminado de antibióticos, o que estimula a pressão seletiva positiva, eliminando os microrganismos mais sensíveis e permitindo a sobrevivência dos mais resistentes via aquisição de genes de resistência e mutação espontânea (VENTOLA, 2015). Essa situação estimulou o desenvolvimento de pesquisas científicas voltadas para a busca de novas moléculas antibióticas efetivas contra esses microrganismos, incluindo *S. aureus* e *P. aeruginosa* (ASOKAN; RAMADHAN; AHMED; SANAD, 2019; TACCONELLI; CARRARA; SAVOLDI; HARBARTH *et al.*, 2018).

Apesar da resistência a antibióticos e fatores de virulência terem conceitos diferentes, sendo que a virulência relaciona-se com a habilidade natural de invadir, colonizar e sobreviver no hospedeiro, enquanto a resistência emerge da interação com antibióticos, não são características independentes, já que ambos atuam em conjunto visando o desenvolvimento e manutenção da infecção (CEPAS; SOTO, 2020). Nesse contexto, a terapia antivirulência apresenta-se como uma alternativa promissora para ajudar a combater infecções resistentes, pois ela visa atuar sobre os fatores de virulência bacterianos, enfraquecendo esses microrganismos e atenuando sua patogenicidade, deixando-os mais suscetíveis à ação do

sistema imune do hospedeiro e aos próprios antibióticos (SILVA; ZIMMER; MACEDO; TRENTIN, 2016). Ainda, o ambiente marinho, destacando-se os microrganismos marinhos, especialmente bactérias, são fontes promissoras de produção de novas moléculas com propriedades antimicrobianas por possuírem características bioquímicas, moleculares e fisiológicas diversificadas devido ao ambiente adverso, rico em sal, com altas pressões e baixas temperaturas, diferentes das bactérias terrestres (AMEEN; ALNADHARI; AL-HOMAIDAN, 2021; ROMANO; COSTANTINI; SANSONE; LAURITANO *et al.*, 2017).

Microrganismos associados às esponjas marinhas sobrevivem em um ambiente pobre em nutrientes e desfavorável, o que estimula a produção de uma variedade de metabólitos para resistir à essas condições (ANTENEH; YANG; BROWN; FRANCO, 2021). Dentre esses compostos, já foram identificadas moléculas capazes de inibir o biofilme de *Staphylococcus* spp. (BALASUBRAMANIAN; OTHMAN; KAMPIK; STOPPER *et al.*, 2017; NUNES; ROSA; CANELLAS; ROMANOS *et al.*, 2021; SCOPEL; ABRAHAM; HENRIQUES; MACEDO, 2013).

Com base nessas informações, o presente estudo buscou, inicialmente, identificar metabólitos secundários produzidos por bactérias isoladas de esponjas marinhas, isto é, moléculas de baixo peso molecular com bioatividade contra biofilme, avaliando de forma concomitante atividades antibióticas. Entretanto, posteriormente, foram percebidas atividades antibiofilme de moléculas maiores, como enzimas, o que redirecionou o objetivo do trabalho, generalizando o termo para “metabólitos”.

Após realizar um rastreamento com esses metabólitos, como descrito no capítulo I, confirmou-se o potencial bioativo desses compostos, pois foram identificadas atividades antibióticas contra *S. aureus*, *S. epidermidis* e *P. aeruginosa*, com destaque para a potente inibição de biofilme – sem afetar o crescimento - promovida por proteínas produzidas pelo isolado 208, identificado como *Priestia* sp (previamente conhecido como *Bacillus* spp.). Além

disso, a bactéria 208 e a 266 também foram capazes de erradicar biofilme maduro de *S. aureus*, ou seja, desorganizar a estrutura de EPS já estabelecida e dispersar o biofilme (ROY; TIWARI; DONELLI; TIWARI, 2018). Um esquema geral dos resultados e dados gerados pela presente tese estão apresentados na Figura 9.

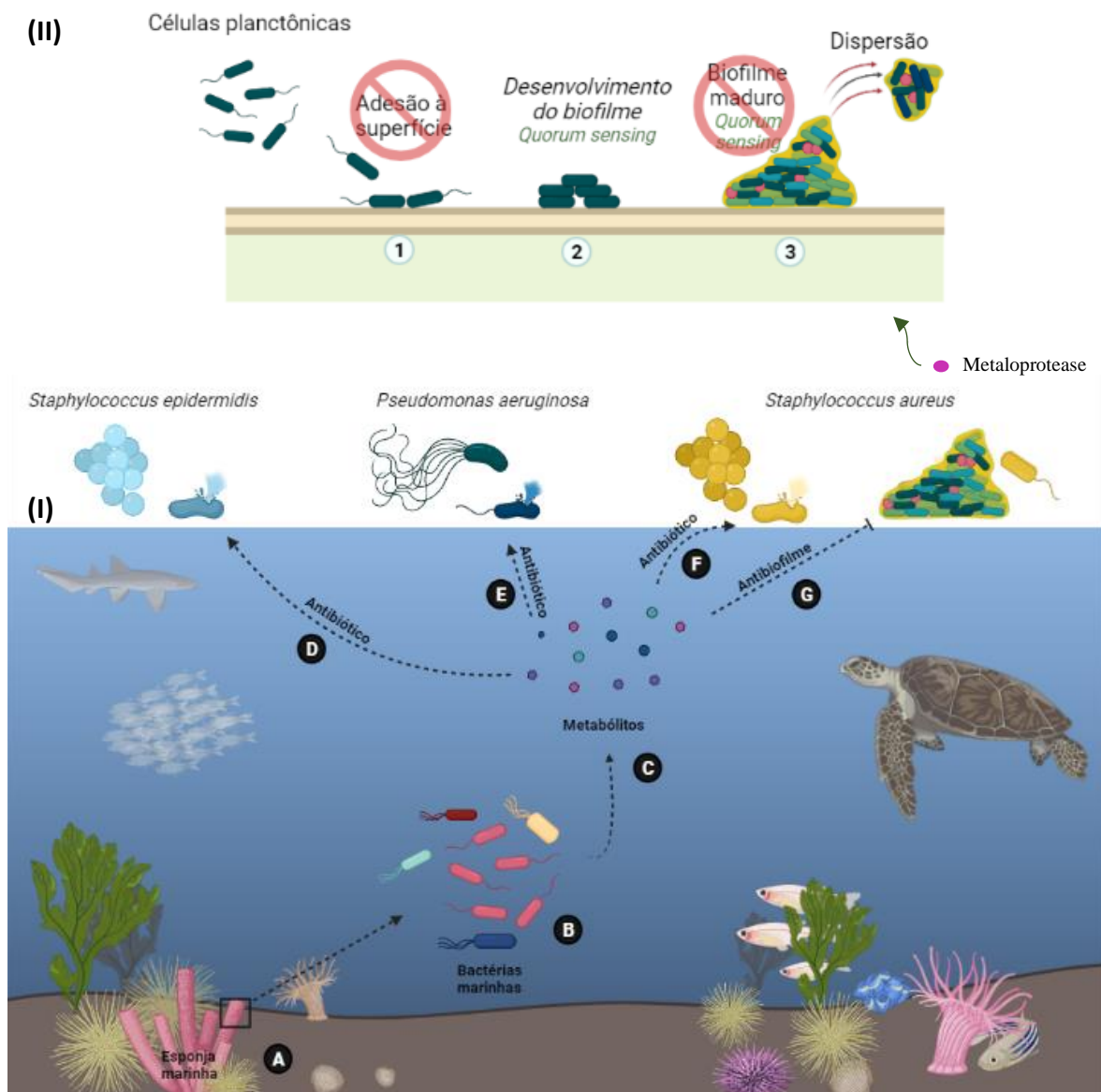


Figura 9. Resumo dos resultados obtidos na presente tese. (I) rastreamento de bioatividade de moléculas produzidas por bactérias associadas às esponjas marinhas. (A) Uma secção em esponja marinha da costa brasileira foi realizada e coletada; (B) Diferentes colônias bacterianas constituintes da biomassa da esponja marinha foram isoladas em laboratório; (C) Estimulou-se a produção de metabólitos de oito bactérias, que foram posteriormente testados para atividades antibióticas e antifimação de biofilme contra cepas de bactérias patogênicas, sendo ela *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* e *Pseudomonas aeruginosa*. (D) Bactéria número 256 (*Bacillus* sp.) apresentou atividade antimicrobiana contra *S. epidermidis* (ATCC 35984); (E) Bactérias BMPV40 (*Vibrio alginolyticus*) e BMPV Mel (*Bacillus stratosphericus*) foram efetivas contra *P. aeruginosa* (ATCC 27853), inibindo o seu crescimento; (F) Bactérias 202 (não identificada) e 266 (*Stenotrophomonas maltophilia*) inibiram o crescimento de *S. aureus* (ATCC 25904); (G) Bactéria 208 (*Priestia* sp.) foi a única célula bacteriana que produziu moléculas capazes de inibir o biofilme bacteriano sem afetar seu crescimento, sendo efetivo contra a cepa de *S. aureus*. Bactérias 208 e 266 também foram efetivos em erradicar biofilme maduro de *S. aureus*. (II) Etapas do desenvolvimento do biofilme de *S. aureus* no qual as moléculas com bioatividade identificadas por esse estudo, incluindo uma metalopeptidase, atuaram sobre, sendo elas inibição da adesão (compostos da bactéria 208) e estimulação da dispersão (compostos das bactérias 208 e 266).

Pelo fato de cerca de 80% das infecções envolverem a presença do biofilme, interferir em alguma etapa de formação dessa estrutura parece ser uma opção efetiva para reduzir a cronicidade de infecções bacterianas, sendo considerados alvos promissores para a antivirulência. Dentre as possibilidades de ação estão: inibir a formação inicial por interferir na adesão; desfazer biofilme maduro e estimular a dispersão celular; afetar a comunicação célula-célula (QS) via bloqueio da produção de sinal, degradando a molécula sinal ou rompendo os receptores do sinal (ANSARI; ABRAHAM; MASSARO; MURPHY *et al.*, 2017; HENTZER; GIVSKOV, 2003; MÜHLEN; DERSCH, 2016).

O presente estudo encontrou compostos marinhos com atuação sobre o início da formação do biofilme de *S. aureus*, evitando o desenvolvimento das etapas estruturais subsequentes, e sobre a arquitetura do biofilme maduro, possivelmente dispendo sobre os componentes da matriz como alvo, estimulando sua dispersão (Figura 9). A PPP (*partial-purified-protein*) produzida pela bactéria 208 (*Priestia sp.*) evitou a formação do biofilme devido à ação de proteínas, incluindo uma metaloprotease, hipoteticamente através de sua interação com estruturas da superfície de *S. aureus*, inibindo a adesão inicial à superfície.

A possível aplicação clínica de moléculas ativas com a mesma atividade da PPP direciona-se para o recobrimento de dispositivos médicos, como já realizado com a adição de antibióticos minociclina e rifampicina em cateteres venoso central, que significativamente reduziu a incidência de quadros de bacteremia causada por *S. aureus* em uma Unidade de Terapia Intensiva (UTI) (CHUNG; TOH, 2014; RAMOS; REITZEL; JIANG; HACHEM *et al.*, 2011), com peptídeo antimicrobiano (AMP) sintético em cateteres urinários testado em ratos (MONTEIRO; COSTA; PIRTILÄ; TEJESVI *et al.*, 2019) e com peptídeos naturais, como o CSP37, produzido pela pimenta vermelha *Capsicum baccatum*, capaz de inibir biofilme de *S. epidermidis* em superfícies recobertas com a molécula (BOROWSKI; BARROS; DA SILVA; LOPES *et al.*, 2020).

As atividades de erradicação de biofilme pré-formado de *S. aureus* também foram observadas pelos extratos brutos teoricamente menores que 10 kDa das bactérias 208 e 266. Agentes que interferem na estrutura madura do biofilme apresentam um grande potencial para tratar infecções vinculadas à presença dessa forma de vida bacteriana e são alvo de vários estudos de grupos de pesquisa. A degradação de componentes do biofilme é uma forma efetiva de enfraquecê-lo e desmontá-lo (CHUNG; TOH, 2014), assim como matá-lo ou induzir a motilidade celular das bactérias através da interferência no QS (CHUNG; POPOVA; MILLIS; MUKHERJEE *et al.*, 2006; RENDUELES; KAPLAN; GHIGO, 2013).

Proteínas e peptídeos presentes na matriz (EPS) são possíveis alvos para estimular essa dispersão do biofilme, já que o próprio *Staphylococcus* spp. secreta proteases extracelulares como serino-protease SplABCDEF, SspA (V8) e metaloprotease Aur (do inglês, *aureolysin*), com expressões reguladas pelo sistema Agr (regulador gene acessório), que atuam realizando a clivagem proteica e desprendimento do biofilme maduro (KRANJEC; MORALES ANGELES; TORRISSEN MÅRLI; FERNÁNDEZ *et al.*, 2021). Portanto, proteases são capazes de desfazer o biofilme maduro de *S. aureus* e podem ser alvo de pesquisas científicas com aplicação na área da terapia antivirulência.

Contudo, apesar de o extrato bruto da fermentação produzido pela bactéria 208 ter induzido a atividade de erradicação, assim como os compostos da bactéria 266, a (s) molécula (s) responsável (is) por isso são desconhecidas, visto que a atividade foi observada com uma mistura complexa de metabólitos produzido por ambas as cepas. Da mesma forma, também não é possível afirmar que a substância secretada por *Priestia* sp. (208), responsável pela antiformação do biofilme, é a mesma molécula que erradicou, apesar de isso ser considerado uma hipótese. De qualquer forma, os dois alvos terapêuticos – formação e erradicação - são efetivos no enfraquecimento de virulência bacteriana.

As espécies do gênero *Priestia* spp. previamente eram identificados como *Bacillus* spp, contudo, o gênero *Bacillus* spp. recentemente, no ano de 2020, sofreu uma reclassificação, pois abrangia mais de 280 espécies, sendo que seus diferentes membros não apresentavam um ancestral comum e compartilhavam poucas características. Esse agrupamento de espécies distintas provavelmente ocorreu, pois, antigamente, o critério que permitia a inclusão de uma bactéria no gênero *Bacillus* era ter a capacidade de produzir esporos na presença de oxigênio. Após essa reavaliação genômica e filogenética, 148 espécies de *Bacillus* spp. foram realocadas em 6 novos gêneros e 11 já existentes. Nesse contexto, o nó evolutivo denominado “megaterium”, que inclui *Bacillus megaterium*, *B. aryabhatai*, *B. flexus*, *B. koreensis*, *B. abyssalis*, *B. endophyticus* e *B. filamentosus*, agora compõem o novo gênero denominado *Priestia* spp. Além desses, 5 espécies que ainda não apresentam o genoma sequenciado (*B. paraflexus*, *B. qingshengii*, *B. taiwanensis*, *B. pseudoflexus* e *B. zanthoxyli*), são indicados a fazer parte desse grupo que compartilha, de forma exclusiva, 2 sequências conservadas na proteína oligoribonuclease NrnB (GUPTA; PATEL; SAINI; CHEN, 2020).

Portanto, os atuais *Bacillus* e *Priestia* spp. pertencem ao filo Firmicutes e comumente compõem a microbiota de esponjas marinhas. Podem apresentar uma prevalência que varia em média de 15-20% entre os isolados bacterianos, considerando que essa população microbiana varia entre esponjas. Além disso, apresentam-se como gêneros prevalentes na produção de compostos ativos com ação antimicrobiana (BIBI; YASIR; AL-SOFYANI; NASEER *et al.*, 2020; DAT; CUC; CUONG; SMIDT *et al.*, 2021; FLEMER; KENNEDY; MARGASSERY; MORRISSEY *et al.*, 2012; LEE; WONG; QIAN, 2009).

Priestia megaterium é um bacilo Gram-positivo descoberto em 1884, encontrado em diversos ambientes, incluindo alimentos, água do mar, cavidade oral de humanos, plantas e solo, indicando um alto nível de adaptação metabólica decorrente dos variáveis habitats que reside (BIEDENDIECK; KNUUTI; MOORE; JAHN, 2021). Há poucos estudos na literatura

descrevendo a função dos metabólitos produzidos por *P. megaterium* com ação antimicrobiana, sendo que a maioria descreve como alvo patógenos de plantas, sendo *P. megaterium* considerado um bom agente de biocontrole por ser efetivo contra fitopatógenos (CHEN; CHEN, 2010; KONG; SHAN; LIU; WANG *et al.*, 2010; XIE; PENG; JI; XIE *et al.*, 2021). Entretanto, um estudo no qual uma cepa de *P. megaterium* foi isolada da microflora oral de voluntários, detectou-se a produção de um peptídeo cíclico pela bactéria, que apresentou atividade antibiótica contra diversos patógenos clínicos, como *Micrococcus luteus*, *Salmonella typhi*, *Escherichia coli*, *P. aeruginosa* e *S. aureus* (AL-THUBIANI; MAHER; FATHI; ABOUREHAB *et al.*, 2018). Considerando que a bactéria 208 provavelmente é uma cepa da espécie *P. megaterium*, o metabólito ativo produzido por ela, com capacidade de inibir biofilme, parece ser uma novidade na literatura.

De qualquer forma, *Bacillus* spp. são conhecidos por sua alta capacidade de produzir metabólitos bioativos, no qual já foram identificados bacteriocinas, lipopeptídeos, toxinas, sideróforos, peptídeos, alcalóides, compostos fenólicos, pigmentos, macrolactin e outros, sendo que a grande maioria desses compostos apresentaram atividade antimicrobiana (ORTIZ; SANSINENEA, 2019). *Bacillus* spp. isolados a partir do ambiente marinho também já mostraram-se efetivos nessa produção, encontrando-se alcalóides de *Bacillus licheniformis* (DEVI; WAHIDULLAH; RODRIGUES; SOUZA, 2010), amidinas de *Bacillus pumilus* (ZHOU; HU; MENG; QU *et al.*, 2018), ciclodepsipeptídeo de *Bacillus silvestris* (PETTIT; KNIGHT; HERALD; PETTIT *et al.*, 2009), compostos fenólicos (*amicoumacins*) e lactonas (macrolactins) de *Bacillus subtilis* (LI; XU; LIU; HAN *et al.*, 2012; TAREQ; KIM; LEE; LEE *et al.*, 2013) e pirrol (composto orgânico aromático heterocíclico) de *Bacillus tequilensis* (KIRAN; SAJAYAN; GOPAL PRIYADHARSHINI; BALAKRISHNAN *et al.*, 2021). Todos os exemplos citados acima apresentaram atividade contra bactérias Gram-positivas, Gram-negativas e/ou fungos.

Já foi relatado também a capacidade de *Bacillus* spp. isolados do ambiente marinho em produzirem moléculas com potencial de inibição de biofilme de bactérias e fungos patogênicos. Nesse contexto, foram identificadas moléculas como lipopeptídeo produzido por *Bacillus amyloliquefaciens* atuando sobre o biofilme de *P. aeruginosa* (SONG; WANG; WANG; LIU et al., 2016), polissacarídeo de *Bacillus licheniformis* inibindo biofilme de *E. coli*, *P. fluorescens*, *Salmonella typhimurium*, *S. aureus* e *S. epidermidis* (SAYEM; MANZO; CIAVATTA; TRAMICE et al., 2011), fenol e furano -produzidos por *B. subtilis*- efetivos contra *Streptococcus pyogenes* e *Candida albicans*, respectivamente (SUBRAMENIUM; SWETHA; IYER; BALAMURUGAN et al., 2018; VISZWAPRIYA; PRITHIKA; DEEBIKA; BALAMURUGAN et al., 2016), além de proteínas sintetizadas por *B. cereus* e *B.licheniformis* atuando sobre Gram-positivas e Gram-negativas (DUSANE; DAMARE; NANCHARAI AH; RAMAIAH et al., 2013; VAIKUNDAMOORTHY; RAJENDRAN; SELVARAJU; MOORTHY et al., 2018).

Dentre os trabalhos descritos na literatura, o estudo realizado por VISZWAPRIYA et al. (2016) relatou o potencial da enzima amilase produzida por *B. cereus*, que foi isolado de amostra de água marinha profunda do estado de Goa, na Índia, em inibir o biofilme de *P. aeruginosa* e *S. aureus*. Em concordância, a presente tese relatou atividade antiformação de biofilme por pelo menos uma aminopeptidase, possivelmente pertencente à família M28, produzida por uma bactéria marinha do gênero *Priestia* sp., também efetiva contra *S. aureus*. Ambos os estudos reforçam tanto o potencial biotecnológico de bactérias marinhas em sintetizar metabólitos com ação contra patógenos bacterianos, mais especificamente antivirulência, quanto a de enzimas em serem agentes antibiofilme.

Entretanto, enquanto a amilase parece atuar enfraquecendo proteínas, carboidratos e lipídeos que compõem a matriz extracelular, degradando-os (KALPANA; AARTHY; PANDIAN, 2012; VAIKUNDAMOORTHY; RAJENDRAN; SELVARAJU; MOORTHY et

al., 2018), as hipóteses de mecanismos de atuação de proteases contra biofilme de *S. aureus* incluem: atuação sobre proteínas de adesão célula-célula e de interação com as superfícies, impedindo a adesão inicial e evitando a primeira etapa de desenvolvimento do biofilme (CAROTHERS; LIANG; MAYFIELD; DONAHUE *et al.*, 2020); atuação no *quorum-sensing*, por ação positiva sobre o gene regulador *agr* em sistemas independentes de *ica*, que estimula produção de proteases estreptocócicas e conseqüentemente a dispersão de biofilme (BOLES; HORSWILL, 2008; PARK; LEE; CHO; HERZBERG *et al.*, 2012; PARK; LEE; KIM; LEE *et al.*, 2012); atuando sobre componentes da matriz extracelular como PNAG (poli-n-acetilglucosamina), principal constituinte do biofilme de *S. aureus* (juntamente com ácido teicóico) (CHAIGNON; SADOVSKAYA; RAGUNAH; RAMASUBBU *et al.*, 2007). A variedade desses diferentes mecanismos já descritos pode ser decorrente dos diferentes tipos de protease e da heterogeneidade da matriz do biofilme entre as cepas bacterianas.

Papa *et al.*, (2013) descreveu a atividade -contra o biofilme de *S. aureus*, sem interferir no crescimento bacteriano - de uma peptidase isolada de *Serratia marcescens* (serratiopeptidase- SPEP), uma metaloproteína extracelular que apresenta um domínio catalítico dependente de zinco para a atividade proteolítica, de forma similar a peptidase da família M28. O estudo sugeriu que a SPEP afeta o biofilme através da remoção ou regulação negativa de proteínas de superfície específicas bacterianas (PAPA; ARTINI; CELLINI; TILOTTA *et al.*, 2013). Papa *et al* também confirmou a ação proteolítica da enzima proteinase K sobre proteínas de superfície/adesão de estafilococos, concordando com estudos prévios, reforçando o mecanismo de atuação dessa serino-protease (KUMAR SHUKLA; RAO, 2013; PAPA; ARTINI; CELLINI; TILOTTA *et al.*, 2013). Esses dados possibilitam hipotetizar que a aminopeptidase descrita no presente estudo possa também interagir com estruturas da superfície de *S. aureus*.

Metaloproteases são um grupo de diversas enzimas proteolíticas distribuídas em famílias de M1 até M91, cada uma representando um conjunto de proteases homólogas. Geralmente suas atividades são mediadas por íons, sendo o zinco o mais comum, responsáveis por auxiliar a ligação da água na formação da ligação peptídica (HECHT; WYTIAZ; AST; SCHULDINER *et al.*, 2013). Na literatura, já foi reportado que *Acanthamoeba* spp. secreta aminopeptidase da família M28 capaz de degradar proteínas do sistema imune inato (sistema complemento) de humanos (HUANG; CHANG; SHIH; LIN *et al.*, 2019). Um membro dessa família também já foi caracterizada em *Saccharomyces cerevisiae* (HECHT; WYTIAZ; AST; SCHULDINER *et al.*, 2013), assim como uma peptidase extracelular produzida por *P. aeruginosa* que possivelmente é um novo membro da mesma família (CAHAN; AXELRAD; SAFRIN; OHMAN *et al.*, 2001). Além disso, também já foi identificada uma aminopeptidase (BSAP) de *Bacillus subtilis*, codificado pelo gene *ywaD*, pertencente à família M28 (FUNDOIANO-HERSHCOVITZ; RABINOVITCH; SHULAMI; REILAND *et al.*, 2005; GAO; LIU; CUI; ZHOU *et al.*, 2014).

Nesse estudo de Fundoiano-Hershcovitz *et al.* (2005), o produto do gene *ywad* de *B. subtilis* foi classificado como metalopeptidase M28, no qual sua atividade catalítica foi confirmada incubando a enzima com diversos inibidores. Desses, observou-se que apenas EDTA e 1,10-fenantrolina afetaram a atividade da enzima, sendo insensível a PMSF (inibidor de serino-protease) e pepstatina (inibidor de proteases aspárticas), indicando a necessidade de ter pelo menos um íon metal para sua funcionalidade. Esse resultado concorda com o observado no capítulo II dessa tese, no qual a enzima ativa perdeu atividade também na presença dos mesmos dois inibidores e tem afinidade pelo íon zinco. Portanto, o presente estudo relata, pela primeira vez na literatura, a possibilidade de ao menos uma aminopeptidase sintetizada por *Priestia* sp., possivelmente pertencente à família M28, apresentar potencial para inibir a

formação de biofilme de cepas sensíveis e multirresistentes de *S. aureus*, podendo contribuir para a área de estudo da terapia antivirulência.

Os resultados obtidos na presente tese reforçam o potencial biotecnológico de moléculas produzidas por microrganismos marinhos, destacando a bioatividade de metabólitos secretados por bactérias associadas às esponjas marinhas. O ambiente marinho estimula seus habitantes a produzirem moléculas quimicamente diversas comparado com organismos terrestres, que lhes conferem vantagens adaptativas, o que pode ser amplamente explorado pela indústria farmacêutica.

As bactérias marinhas como espécies do gênero *Bacillus* e *Priestia* spp. são ricas fontes de compostos ativos, no qual já foram identificados alguns com potencial antimicrobiano e antivirulência. O presente estudo reforçou essas ações mostrando a atividade de metabólitos marinhos de origem bacteriana em inibir o crescimento e/ou o biofilme de espécies de *Staphylococcus* spp e *P. aeruginosa*, bactérias de importância clínica e muito relacionadas com infecções nosocomiais e resistentes.

Além disso, enzimas extracelulares com atividade proteolítica de origem bacteriana podem ser uma interessante linha de investigação para sua aplicação na terapia antivirulência, já que claramente sua atividade pode afetar a estrutura do biofilme de bactérias patogênicas. Portanto, podem ser exploradas como uma alternativa para enfraquecer bactérias tolerantes, deixando-as suscetíveis à ação do sistema imune do hospedeiro e antibióticos, contribuindo, assim, para reverter o quadro mundial de agravamento de infecções crônicas.

Como perspectivas desse trabalho, objetiva-se isolar a enzima proteolítica bioativa através de cromatografias de troca iônica e gel filtração e caracterizá-la de forma mais detalhada, avaliando estabilidade frente à diferentes temperaturas e pH, além de testar a atividade frente à presença de substratos específicos para proteases e sua capacidade de romper biofilme formado. Posteriormente, sintetizar peptídeos sintéticos baseados nas sequências de sítios catalíticos da enzima, a fim de otimizar a atividade para uso na indústria farmacêutica.

REFERÊNCIAS

ABDEL-AZIZ, S. M.; ABO ELSOUD, M. M.; ANISE, A. A. H. Chapter 2 - Microbial Biosynthesis: A Repertory of Vital Natural Products. *In: GRUMEZESCU, A. M. e HOLBAN, A. M. (Ed.). Food Biosynthesis: Academic Press, 2017. p. 25-54.*

AL-THUBIANI, A. S. A.; MAHER, Y. A.; FATHI, A.; ABOUREHAB, M. A. S. *et al.* Identification and characterization of a novel antimicrobial peptide compound produced by. **Saudi Pharm J**, 26, n. 8, p. 1089-1097, Dec 2018.

ALTUĞ, G.; ÇİFTÇİ TÜRETKEN, P. S.; KALKAN, S.; TOPALOĞLU, B. The Distribution and Antibacterial Activity of Marine Sponge-Associated Bacteria in the Aegean Sea and the Sea of Marmara, Turkey. **Curr Microbiol**, 78, n. 6, p. 2275-2290, Jun 2021.

AMEEN, F.; ALNADHARI, S.; AL-HOMAIDAN, A. A. Marine microorganisms as an untapped source of bioactive compounds. **Saudi J Biol Sci**, 28, n. 1, p. 224-231, Jan 2021.

ANDERSSON, D. I.; HUGHES, D. Microbiological effects of sublethal levels of antibiotics. **Nat Rev Microbiol**, 12, n. 7, p. 465-478, Jul 2014.

ANSARI, J. M.; ABRAHAM, N. M.; MASSARO, J.; MURPHY, K. *et al.* Anti-Biofilm Activity of a Self-Aggregating Peptide against. **Front Microbiol**, 8, p. 488, 2017.

ANTENEH, Y. S.; YANG, Q.; BROWN, M. H.; FRANCO, C. M. M. Antimicrobial Activities of Marine Sponge-Associated Bacteria. **Microorganisms**, 9, n. 1, Jan 14 2021.

ASOKAN, G. V.; RAMADHAN, T.; AHMED, E.; SANAD, H. WHO Global Priority Pathogens List: A Bibliometric Analysis of Medline-PubMed for Knowledge Mobilization to Infection Prevention and Control Practices in Bahrain. **Oman Med J**, 34, n. 3, p. 184-193, May 2019.

ATANASOV, A. G.; ZOTCHEV, S. B.; DIRSCH, V. M.; SUPURAN, C. T. *et al.* Natural products in drug discovery: advances and opportunities. **Nat Rev Drug Discov**, 20, n. 3, p. 200-216, 03 2021.

AUTIERO, I.; COSTANTINI, S.; COLONNA, G. Modeling of the bacterial mechanism of methicillin-resistance by a systems biology approach. **PLoS One**, 4, n. 7, p. e6226, Jul 2009.

AZAM, M. W.; KHAN, A. U. Updates on the pathogenicity status of *Pseudomonas aeruginosa*. **Drug Discov Today**, 24, n. 1, p. 350-359, 01 2019.

BAKKIYARAJ, D.; PANDIAN, S. K. In vitro and in vivo antibiofilm activity of a coral associated actinomycete against drug resistant *Staphylococcus aureus* biofilms. **Biofouling**, 26, n. 6, p. 711-717, Aug 2010.

BALASUBRAMANIAN, S.; OTHMAN, E. M.; KAMPIK, D.; STOPPER, H. *et al.* Marine Sponge-Derived. **Front Microbiol**, 8, p. 236, 2017.

BARDOEL, B. W.; VOS, R.; BOUMAN, T.; AERTS, P. C. *et al.* Evasion of Toll-like receptor 2 activation by staphylococcal superantigen-like protein 3. **J Mol Med (Berl)**, 90, n. 10, p. 1109-1120, Oct 2012.

- BECEIRO, A.; TOMÁS, M.; BOU, G. Antimicrobial resistance and virulence: a successful or deleterious association in the bacterial world? **Clin Microbiol Rev**, 26, n. 2, p. 185-230, Apr 2013.
- BECKER, S.; FRANKEL, M. B.; SCHNEEWIND, O.; MISSIAKAS, D. Release of protein A from the cell wall of *Staphylococcus aureus*. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 111, n. 4, p. 1574-1579, Jan 2014.
- BESTEBROER, J.; POPPELIER, M. J.; ULFMAN, L. H.; LENTING, P. J. *et al.* Staphylococcal superantigen-like 5 binds PSGL-1 and inhibits P-selectin-mediated neutrophil rolling. **Blood**, 109, n. 7, p. 2936-2943, Apr 2007.
- BIBI, F.; NASEER, M. I.; AZHAR, E. I. Assessing the diversity of bacterial communities from marine sponges and their bioactive compounds. **Saudi J Biol Sci**, 28, n. 5, p. 2747-2754, May 2021.
- BIBI, F.; YASIR, M.; AL-SOFYANI, A.; NASEER, M. I. *et al.* Antimicrobial activity of bacteria from marine sponge. **Saudi J Biol Sci**, 27, n. 4, p. 1139-1147, Apr 2020.
- BIEDENDIECK, R.; KNUUTI, T.; MOORE, S. J.; JAHN, D. The "beauty in the beast"-the multiple uses of *Priestia megaterium* in biotechnology. **Appl Microbiol Biotechnol**, Jul 15 2021.
- BISTER, B.; BISCHOFF, D.; STRÖBELE, M.; RIEDLINGER, J. *et al.* Abyssomicin C-A polycyclic antibiotic from a marine Verrucosipora strain as an inhibitor of the p-aminobenzoic acid/tetrahydrofolate biosynthesis pathway. **Angew Chem Int Ed Engl**, 43, n. 19, p. 2574-2576, May 03 2004.
- BLACKMAN, L. D.; QU, Y.; CASS, P.; LOCOCK, K. E. S. Approaches for the inhibition and elimination of microbial biofilms using macromolecular agents. **Chem Soc Rev**, 50, n. 3, p. 1587-1616, Feb 2021.
- BLAIR, J. M.; WEBBER, M. A.; BAYLAY, A. J.; OGBOLU, D. O. *et al.* Molecular mechanisms of antibiotic resistance. **Nat Rev Microbiol**, 13, n. 1, p. 42-51, Jan 2015.
- BLUNT, J. W.; CARROLL, A. R.; COPP, B. R.; DAVIS, R. A. *et al.* Marine natural products. **Nat Prod Rep**, 35, n. 1, p. 8-53, 01 16 2018.
- BOLES, B. R.; HORSWILL, A. R. Agr-mediated dispersal of *Staphylococcus aureus* biofilms. **PLoS Pathog**, 4, n. 4, p. e1000052, Apr 25 2008.
- BOLES, B. R.; HORSWILL, A. R. Staphylococcal biofilm disassembly. **Trends Microbiol**, 19, n. 9, p. 449-455, Sep 2011.
- BORGES, A.; SIMÕES, M. Quorum Sensing Inhibition by Marine Bacteria. **Mar Drugs**, 17, n. 7, Jul 23 2019.
- BOROWSKI, R. G. V.; BARROS, M. P.; DA SILVA, D. B.; LOPES, N. P. *et al.* Red pepper peptide coatings control *Staphylococcus epidermidis* adhesion and biofilm formation. **Int J Pharm**, 574, p. 118872, Jan 25 2020.

- BRINKMANN, C. M.; MARKER, A.; KURTBÖKE, D. Í. An Overview on Marine Sponge-Symbiotic Bacteria as Unexhausted Sources for Natural Product Discovery. **Diversity**, 9, n. 4, 2017.
- BUCHAN, K. D.; FOSTER, S. J.; RENSHAW, S. A. *Staphylococcus aureus*: setting its sights on the human innate immune system. **Microbiology (Reading)**, 165, n. 4, p. 367-385, 04 2019.
- BUTLER, M. S. The role of natural product chemistry in drug discovery. **J Nat Prod**, 67, n. 12, p. 2141-2153, Dec 2004.
- BÜTTNER, H.; MACK, D.; ROHDE, H. Structural basis of *Staphylococcus epidermidis* biofilm formation: mechanisms and molecular interactions. **Front Cell Infect Microbiol**, 5, p. 14, 2015.
- CAHAN, R.; AXELRAD, I.; SAFRIN, M.; OHMAN, D. E. *et al.* A secreted aminopeptidase of *Pseudomonas aeruginosa*. Identification, primary structure, and relationship to other aminopeptidases. **J Biol Chem**, 276, n. 47, p. 43645-43652, Nov 23 2001.
- CAROTHERS, K. E.; LIANG, Z.; MAYFIELD, J.; DONAHUE, D. L. *et al.* The Streptococcal Protease SpeB Antagonizes the Biofilms of the Human Pathogen *Staphylococcus aureus* USA300 through Cleavage of the Staphylococcal SdrC Protein. **J Bacteriol**, 202, n. 11, 05 11 2020.
- CARROLL, A. R.; COPP, B. R.; DAVIS, R. A.; KEYZERS, R. A. *et al.* Marine natural products. **Nat Prod Rep**, 36, n. 1, p. 122-173, 01 01 2019.
- CASADEVALL, A.; PIROFSKI, L. A. Virulence factors and their mechanisms of action: the view from a damage-response framework. **J Water Health**, 7 Suppl 1, p. S2-S18, 2009.
- CENTERS FOR DISEASE CONTROL (CDC). Antibiotic Resistance Threats in the United States, 2019. Atlanta, GA: U.S. Department of Health and Human Services, CDC; 2019. Available online: The full 2019 AR Threats Report, including methods and appendices. DOI: <http://dx.doi.org/10.15620/cdc:82532>. Disponível em: <www.cdc.gov/DrugResistance/Biggest-Threats.html>. Acesso em: 31 ago 2021.
- CEPAS, V.; SOTO, S. M. Relationship between Virulence and Resistance among Gram-Negative Bacteria. **Antibiotics (Basel)**, 9, n. 10, Oct 20 2020.
- CHAIGNON, P.; SADOVSKAYA, I.; RAGUNAH, C.; RAMASUBBU, N. *et al.* Susceptibility of staphylococcal biofilms to enzymatic treatments depends on their chemical composition. **Appl Microbiol Biotechnol**, 75, n. 1, p. 125-132, May 2007.
- CHANG, H.; ZHOU, J.; ZHU, X.; YU, S. *et al.* Strain identification and quorum sensing inhibition characterization of marine-derived. **R Soc Open Sci**, 4, n. 3, p. 170025, Mar 2017.
- CHEN, L.; CHEN, W. Isolation and characterization of a novel small antifungal peptide from *Bacillus megaterium* D4 Isolated from the dung of wild plateau yak in China. **Protein Pept Lett**, 17, n. 4, p. 542-546, Apr 2010.
- CHEUNG, G. Y. C.; BAE, J. S.; OTTO, M. Pathogenicity and virulence of. **Virulence**, 12, n. 1, p. 547-569, 12 2021.

CHEUNG, R. C.; NG, T. B.; WONG, J. H. Marine Peptides: Bioactivities and Applications. **Mar Drugs**, 13, n. 7, p. 4006-4043, Jun 2015.

CHU, J.; WANG, Y.; ZHAO, B.; ZHANG, X. M. *et al.* Isolation and identification of new antibacterial compounds from *Bacillus pumilus*. **Appl Microbiol Biotechnol**, 103, n. 20, p. 8375-8381, Oct 2019.

CHUNG, M.-C.; POPOVA, T. G.; MILLIS, B. A.; MUKHERJEE, D. V. *et al.* Secreted Neutral Metalloproteases of *Bacillus anthracis* as Candidate Pathogenic Factors*. **Journal of Biological Chemistry**, 281, n. 42, p. 31408-31418, 2006/10/20/ 2006.

CHUNG, P. Y.; TOH, Y. S. Anti-biofilm agents: recent breakthrough against multi-drug resistant *Staphylococcus aureus*. **Pathog Dis**, 70, n. 3, p. 231-239, Apr 2014.

CIOFU, O.; TOLKER-NIELSEN, T. Tolerance and Resistance of *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms to Antimicrobial Agents-How *P. aeruginosa* Can Escape Antibiotics. **Front Microbiol**, 10, p. 913, 2019.

DAT, T. T. H.; CUC, N. T. K.; CUONG, P. V.; SMIDT, H. *et al.* Diversity and Antimicrobial Activity of Vietnamese Sponge-Associated Bacteria. **Mar Drugs**, 19, n. 7, Jun 22 2021.

DAVIES, D. Understanding biofilm resistance to antibacterial agents. **Nat Rev Drug Discov**, 2, n. 2, p. 114-122, Feb 2003.

DE CARVALHO, C. C.; FERNANDES, P. Production of metabolites as bacterial responses to the marine environment. **Mar Drugs**, 8, n. 3, p. 705-727, Mar 2010.

DE KRAKER, M. E.; STEWARDSON, A. J.; HARBARTH, S. Will 10 Million People Die a Year due to Antimicrobial Resistance by 2050? **PLoS Med**, 13, n. 11, p. e1002184, Nov 2016.

DE MOL, M. L.; SNOECK, N.; DE MAESENEIRE, S. L.; SOETAERT, W. K. Hidden antibiotics: Where to uncover? **Biotechnol Adv**, 36, n. 8, p. 2201-2218, 12 2018.

DE SOUZA, C. P. Pathogenicity mechanisms of prokaryotic cells: an evolutionary view. **Braz J Infect Dis**, 7, n. 1, p. 23-31, Feb 2003.

DEMAIN, A. L.; FANG, A. The natural functions of secondary metabolites. **Adv Biochem Eng Biotechnol**, 69, p. 1-39, 2000.

DERSCH, P.; STADLER, M. How to Overcome the Antibiotic Crisis : Facts, Challenges, Technologies and Future Perspectives. **Cham: Springer International Publishing** : Imprint: Springer., 2016. 97833194928410070-217X ;. DOI 10.1007/978-3-319-49284-1. 1 online resource (XII, 496 pages) p.

DEVI, P.; WAHIDULLAH, S.; RODRIGUES, C.; SOUZA, L. D. The sponge-associated bacterium *Bacillus licheniformis* SAB1: a source of antimicrobial compounds. **Mar Drugs**, 8, n. 4, p. 1203-1212, Apr 09 2010.

DICKEY, S. W.; CHEUNG, G. Y. C.; OTTO, M. Different drugs for bad bugs: antivirulence strategies in the age of antibiotic resistance. **Nat Rev Drug Discov**, 16, n. 7, p. 457-471, Jul 2017.

DONLAN, R. M. Biofilm formation: a clinically relevant microbiological process. **Clin Infect Dis**, 33, n. 8, p. 1387-1392, Oct 2001a.

DONLAN, R. M. Biofilms and device-associated infections. **Emerg Infect Dis**, 7, n. 2, p. 277-281, 2001 Mar-Apr 2001b.

DUSANE, D. H.; DAMARE, S. R.; NANCHARAI, Y. V.; RAMAIAH, N. *et al.* Disruption of microbial biofilms by an extracellular protein isolated from epibiotic tropical marine strain of *Bacillus licheniformis*. **PLoS One**, 8, n. 5, p. e64501, 2013.

FAULKNER, D. J. Marine natural products. **Nat Prod Rep**, 19, n. 1, p. 1-48, Feb 2002.

FEWER, D. P.; METSÄ-KETELÄ, M. A pharmaceutical model for the molecular evolution of microbial natural products. **FEBS J**, 287, n. 7, p. 1429-1449, 04 2020.

FLEMER, B.; KENNEDY, J.; MARGASSERY, L. M.; MORRISSEY, J. P. *et al.* Diversity and antimicrobial activities of microbes from two Irish marine sponges, *Suberites carnosus* and *Leucosolenia* sp. **J Appl Microbiol**, 112, n. 2, p. 289-301, Feb 2012.

FLEMMING, H. C.; WUERTZ, S. Bacteria and archaea on Earth and their abundance in biofilms. **Nat Rev Microbiol**, 17, n. 4, p. 247-260, 04 2019.

FORD, C. A.; HURFORD, I. M.; CASSAT, J. E. Antivirulence Strategies for the Treatment of. **Front Microbiol**, 11, p. 632706, 2020.

FOSTER, C. E.; KOK, M.; FLORES, A. R.; MINARD, C. G. *et al.* Adhesin genes and biofilm formation among pediatric *Staphylococcus aureus* isolates from implant-associated infections. **PLoS One**, 15, n. 6, p. e0235115, 2020.

FOSTER, T. J. Antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus*. Current status and future prospects. **FEMS Microbiol Rev**, 41, n. 3, p. 430-449, 05 01 2017.

FOSTER, T. J. Surface Proteins of *Staphylococcus aureus*. **Microbiol Spectr**, 7, n. 4, 07 2019.

FUNDOIANO-HERSHCOVITZ, Y.; RABINOVITCH, L.; SHULAMI, S.; REILAND, V. *et al.* The *ywad* gene from *Bacillus subtilis* encodes a double-zinc aminopeptidase. **FEMS Microbiol Lett**, 243, n. 1, p. 157-163, Feb 01 2005.

GAO, P.; HO, P. L.; YAN, B.; SZE, K. H. *et al.* Suppression of. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 115, n. 31, p. 8003-8008, 07 31 2018.

GAO, X.; LIU, Z.; CUI, W.; ZHOU, L. *et al.* Enhanced thermal stability and hydrolytic ability of *Bacillus subtilis* aminopeptidase by removing the thermal sensitive domain in the non-catalytic region. **PLoS One**, 9, n. 3, p. e92357, 2014.

GELLATLY, S. L.; HANCOCK, R. E. *Pseudomonas aeruginosa*: new insights into pathogenesis and host defenses. **Pathog Dis**, 67, n. 3, p. 159-173, Apr 2013.

GENILLOU, O. Natural products discovery and potential for new antibiotics. **Curr Opin Microbiol**, 51, p. 81-87, 10 2019.

- GIORDANO, D.; COPPOLA, D.; RUSSO, R.; DENARO, R. *et al.* Marine Microbial Secondary Metabolites: Pathways, Evolution and Physiological Roles. **Adv Microb Physiol**, 66, p. 357-428, 2015.
- GORDON, R. J.; LOWY, F. D. Pathogenesis of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection. **Clin Infect Dis**, 46 Suppl 5, p. S350-359, Jun 2008.
- GOWRISHANKAR, S.; DUNCUN MOSIOMA, N.; KARUTHA PANDIAN, S. Coral-Associated Bacteria as a Promising Antibiofilm Agent against Methicillin-Resistant and -Susceptible *Staphylococcus aureus* Biofilms. **Evid Based Complement Alternat Med**, 2012, p. 862374, 2012.
- GOWRISHANKAR, S.; PANDIAN, S. K.; BALASUBRAMANIAM, B.; BALAMURUGAN, K. Quorum quelling efficacy of marine cyclic dipeptide -cyclo(L-leucyl-L-prolyl) against the uropathogen *Serratia marcescens*. **Food Chem Toxicol**, 123, p. 326-336, Jan 2019.
- GOWRISHANKAR, S.; POORNIMA, B.; PANDIAN, S. K. Inhibitory efficacy of cyclo(L-leucyl-L-prolyl) from mangrove rhizosphere bacterium-*Bacillus amyloliquefaciens* (MMS-50) toward cariogenic properties of *Streptococcus mutans*. **Res Microbiol**, 165, n. 4, p. 278-289, May 2014.
- GOWRISHANKAR, S.; SIVARANJANI, M.; KAMALADEVI, A.; RAVI, A. V. *et al.* Cyclic dipeptide cyclo(l-leucyl-l-prolyl) from marine *Bacillus amyloliquefaciens* mitigates biofilm formation and virulence in *Listeria monocytogenes*. **Pathog Dis**, 74, n. 4, p. ftw017, Jun 2016.
- GUO, Y.; SONG, G.; SUN, M.; WANG, J. *et al.* Prevalence and Therapies of Antibiotic-Resistance in. **Front Cell Infect Microbiol**, 10, p. 107, 2020.
- GUPTA, R. S.; PATEL, S.; SAINI, N.; CHEN, S. Robust demarcation of 17 distinct *Bacillus* species clades, proposed as novel Bacillaceae genera, by phylogenomics and comparative genomic analyses: description of *Robertmurraya kyonggiensis* sp. nov. and proposal for an emended genus *Bacillus* limiting it only to the members of the *Subtilis* and *Cereus* clades of species. **Int J Syst Evol Microbiol** 70(11):5753–5798, 2020
- GUTIÉRREZ-BARRANQUERO, J. A.; REEN, F. J.; PARAGES, M. L.; MCCARTHY, R. *et al.* Disruption of N-acyl-homoserine lactone-specific signalling and virulence in clinical pathogens by marine sponge bacteria. **Microb Biotechnol**, 12, n. 5, p. 1049-1063, 09 2019.
- HASTE, N. M.; THIENPHRAPA, W.; TRAN, D. N.; LOESGEN, S. *et al.* Activity of the thiopeptide antibiotic nosiheptide against contemporary strains of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **J Antibiot (Tokyo)**, 65, n. 12, p. 593-598, Dec 2012.
- HARVEY, A. L.; EDRADA-EBEL, R.; QUINN, R. J. The re-emergence of natural products for drug discovery in the genomics era. **Nat Rev Drug Discov**, 14, n. 2, p. 111-129, Feb 2015.
- HECHT, K. A.; WYTIAZ, V. A.; AST, T.; SCHULDINER, M. *et al.* Characterization of an M28 metalloprotease family member residing in the yeast vacuole. **FEMS Yeast Res**, 13, n. 5, p. 471-484, Aug 2013.

HENTSCHEL, U.; HOPKE, J.; HORN, M.; FRIEDRICH, A. B. *et al.* Molecular evidence for a uniform microbial community in sponges from different oceans. **Appl Environ Microbiol**, 68, n. 9, p. 4431-4440, Sep 2002.

HENTZER, M.; GIVSKOV, M. Pharmacological inhibition of quorum sensing for the treatment of chronic bacterial infections. **J Clin Invest**, 112, n. 9, p. 1300-1307, Nov 2003.

HIGGINS, P. G.; FLUIT, A. C.; SCHMITZ, F. J. Fluoroquinolones: structure and target sites. **Curr Drug Targets**, 4, n. 2, p. 181-190, Feb 2003.

HOHMANN, C.; SCHNEIDER, K.; BRUNTNER, C.; IRRAN, E. *et al.* Caboxamycin, a new antibiotic of the benzoxazole family produced by the deep-sea strain *Streptomyces* sp. NTK 937. **J Antibiot (Tokyo)**, 62, n. 2, p. 99-104, Feb 2009.

HUANG, J. M.; CHANG, Y. T.; SHIH, M. H.; LIN, W. C. *et al.* Identification and characterization of a secreted M28 aminopeptidase protein in *Acanthamoeba*. **Parasitol Res**, 118, n. 6, p. 1865-1874, Jun 2019.

HUTCHINGS, M. I.; TRUMAN, A. W.; WILKINSON, B. Antibiotics: past, present and future. **Curr Opin Microbiol**, 51, p. 72-80, 10 2019.

INDRANINGRAT, A. A.; SMIDT, H.; SIPKEMA, D. Bioprospecting Sponge-Associated Microbes for Antimicrobial Compounds. **Mar Drugs**, 14, n. 5, May 02 2016.

IWASE, T.; UEHARA, Y.; SHINJI, H.; TAJIMA, A. *et al.* *Staphylococcus epidermidis* Esp inhibits *Staphylococcus aureus* biofilm formation and nasal colonization. **Nature**, 465, n. 7296, p. 346-349, May 20 2010.

JABILA MARY, T. R.; KANNAN, R. R.; INIYAN, A. M.; RAMACHANDRAN, D. *et al.* Cell wall distraction and biofilm inhibition of marine *Streptomyces* derived angucycline in methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. **Microb Pathog**, 150, p. 104712, Jan 2021.

JAMAL, M.; AHMAD, W.; ANDLEEB, S.; JALIL, F. *et al.* Bacterial biofilm and associated infections. **J Chin Med Assoc**, 81, n. 1, p. 7-11, 01 2018.

JIMENEZ, P. C.; WILKE, D. V.; COSTA-LOTUFO, L. V. Marine drugs for cancer: surfacing biotechnological innovations from the oceans. **Clinics (Sao Paulo)**, 73, n. suppl 1, p. e482s, 08 20 2018.

JIMÉNEZ, C. Marine Natural Products in Medicinal Chemistry. **ACS Med Chem Lett**, 9, n. 10, p. 959-961, Oct 2018.

JIN, T.; BOKAREWA, M.; FOSTER, T.; MITCHELL, J. *et al.* *Staphylococcus aureus* resists human defensins by production of staphylokinase, a novel bacterial evasion mechanism. **J Immunol**, 172, n. 2, p. 1169-1176, Jan 2004.

JOHN, J. The treatment of resistant staphylococcal infections. **F1000Res**, 9, 2020.

JOSSE, J.; LAURENT, F.; DIOT, A. Staphylococcal Adhesion and Host Cell Invasion: Fibronectin-Binding and Other Mechanisms. **Front Microbiol**, 8, p. 2433, 2017.

KALPANA, B. J.; AARTHY, S.; PANDIAN, S. K. Antibiofilm activity of α -amylase from *Bacillus subtilis* S8-18 against biofilm forming human bacterial pathogens. **Appl Biochem Biotechnol**, 167, n. 6, p. 1778-1794, Jul 2012.

KAPOOR, G.; SAIGAL, S.; ELONGAVAN, A. Action and resistance mechanisms of antibiotics: A guide for clinicians. **J Anaesthesiol Clin Pharmacol**, 33, n. 3, p. 300-305, 2017 Jul-Sep 2017.

KATZ, L.; BALTZ, R. H. Natural product discovery: past, present, and future. **J Ind Microbiol Biotechnol**, 43, n. 2-3, p. 155-176, Mar 2016.

KHAN, H. A. K.; BAIG, F. K. B.; MEHBOOB, R. Nosocomial infections: Epidemiology, prevention, control and surveillance.: **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**. 7: 478-482 p. 2017.

KIRAN, G. S.; PRIYADHARSINI, S.; SAJAYAN, A.; RAVINDRAN, A. *et al.* An antibiotic agent pyrrolo[1,2-a]pyrazine-1,4-dione,hexahydro isolated from a marine bacteria *Bacillus tequilensis* MSI45 effectively controls multi-drug resistant *Staphylococcus aureus*. **RSC Advances**, 8, n. 32, p. 17837 - 17846, 2018.

KIRAN, G. S.; SAJAYAN, A.; GOPAL PRIYADHARSHINI; BALAKRISHNAN, A. *et al.* A novel anti-infective molecule nesfactin identified from sponge associated bacteria *Nesterenkonia* sp. MSA31 against multidrug resistant *Pseudomonas aeruginosa*. **Microb Pathog**, 157, p. 104923, Aug 2021.

KIRAN, G. S.; SEKAR, S.; RAMASAMY, P.; THINESH, T. *et al.* Marine sponge microbial association: Towards disclosing unique symbiotic interactions. **Mar Environ Res**, 140, p. 169-179, Sep 2018.

KLEINSCHMIDT, S.; HUYGENS, F.; FAOAGALI, J.; RATHNAYAKE, I. U. *et al.* *Staphylococcus epidermidis* as a cause of bacteremia. **Future Microbiol**, 10, n. 11, p. 1859-1879, 2015.

KONG, Q.; SHAN, S.; LIU, Q.; WANG, X. *et al.* Biocontrol of *Aspergillus flavus* on peanut kernels by use of a strain of marine *Bacillus megaterium*. **Int J Food Microbiol**, 139, n. 1-2, p. 31-35, Apr 30 2010.

KOYMANS, K. J.; BISSCHOP, A.; VUGHS, M. M.; VAN KESSEL, K. P. *et al.* Staphylococcal Superantigen-Like Protein 1 and 5 (SSL1 & SSL5) Limit Neutrophil Chemotaxis and Migration through MMP-Inhibition. **Int J Mol Sci**, 17, n. 7, Jul 2016.

KRANJEC, C.; MORALES ANGELES, D.; TORRISSEN MÅRLI, M.; FERNÁNDEZ, L. *et al.* Staphylococcal Biofilms: Challenges and Novel Therapeutic Perspectives. **Antibiotics (Basel)**, 10, n. 2, Jan 29 2021.

KUMAR SHUKLA, S.; RAO, T. S. Dispersal of Bap-mediated *Staphylococcus aureus* biofilm by proteinase K. **J Antibiot (Tokyo)**, 66, n. 2, p. 55-60, Feb 2013.

LAUTIÉ, E.; RUSSO, O.; DUCROT, P.; BOUTIN, J. A. Unraveling Plant Natural Chemical Diversity for Drug Discovery Purposes. **Front Pharmacol**, 11, p. 397, 2020.

- LE, K. Y.; OTTO, M. Quorum-sensing regulation in staphylococci-an overview. **Front Microbiol**, 6, p. 1174, 2015.
- LE, T. C.; YANG, I.; YOON, Y. J.; NAM, S. J. *et al.* Ansalactams B-D Illustrate Further Biosynthetic Plasticity within the Ansamycin Pathway. **Org Lett**, 18, n. 9, p. 2256-2259, 05 06 2016.
- LEE, A. S.; DE LENCASTRE, H.; GARAU, J.; KLUYTMANS, J. *et al.* Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Nat Rev Dis Primers**, 4, p. 18033, 05 2018.
- LEE, J.; ZHANG, L. The hierarchy quorum sensing network in *Pseudomonas aeruginosa*. **Protein & cell**, 6, n. 1, p. 26-41, 2015.
- LEE, O. O.; WONG, Y. H.; QIAN, P. Y. Inter- and intraspecific variations of bacterial communities associated with marine sponges from san juan island, washington. **Appl Environ Microbiol**, 75, n. 11, p. 3513-3521, Jun 2009.
- LEITÃO, J. H. Microbial Virulence Factors. **Int J Mol Sci**, 21, n. 15, Jul 2020.
- LEQUETTE, Y.; BOELS, G.; CLARISSE, M.; FAILLE, C. Using enzymes to remove biofilms of bacterial isolates sampled in the food-industry. **Biofouling**, 26, n. 4, p. 421-431, May 2010.
- LERMINIAUX, N. A.; CAMERON, A. D. S. Horizontal transfer of antibiotic resistance genes in clinical environments. **Can J Microbiol**, 65, n. 1, p. 34-44, Jan 2019.
- LEWIS, K. The Science of Antibiotic Discovery. **Cell**, 181, n. 1, p. 29-45, 04 2020.
- LI, C. Q.; LIU, W. C.; ZHU, P.; YANG, J. L. *et al.* Phylogenetic diversity of bacteria associated with the marine sponge *Gelliodes carnosa* collected from the Hainan Island coastal waters of the South China Sea. **Microb Ecol**, 62, n. 4, p. 800-812, Nov 2011.
- LI, Y.; XU, Y.; LIU, L.; HAN, Z. *et al.* Five new amicoumacins isolated from a marine-derived bacterium *Bacillus subtilis*. **Mar Drugs**, 10, n. 2, p. 319-328, Feb 2012.
- LISTER, J. L.; HORSWILL, A. R. *Staphylococcus aureus* biofilms: recent developments in biofilm dispersal. **Front Cell Infect Microbiol**, 4, p. 178, 2014.
- LISTER, P. D.; WOLTER, D. J.; HANSON, N. D. Antibacterial-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: clinical impact and complex regulation of chromosomally encoded resistance mechanisms. **Clin Microbiol Rev**, 22, n. 4, p. 582-610, Oct 2009.
- LIU, G. Y.; ESSEX, A.; BUCHANAN, J. T.; DATTA, V. *et al.* *Staphylococcus aureus* golden pigment impairs neutrophil killing and promotes virulence through its antioxidant activity. **J Exp Med**, 202, n. 2, p. 209-215, Jul 2005.
- LIU, M.; EL-HOSSARY, E. M.; OELSCHLAEGER, T. A.; DONIA, M. S. *et al.* Potential of marine natural products against drug-resistant bacterial infections. **Lancet Infect Dis**, 19, n. 7, p. e237-e245, 07 2019.

- LLARRULL, L. I.; FISHER, J. F.; MOBASHERY, S. Molecular basis and phenotype of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus* and insights into new beta-lactams that meet the challenge. **Antimicrob Agents Chemother**, 53, n. 10, p. 4051-4063, Oct 2009.
- MACEDO, A. J.; ABRAHAM, W. R. Can infectious biofilm be controlled by blocking bacterial communication? **Med Chem**, 5, n. 6, p. 517-528, Nov 2009.
- MAGIORAKOS, A. P.; SRINIVASAN, A.; CAREY, R. B.; CARMELI, Y. *et al.* Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. **Clin Microbiol Infect**, 18, n. 3, p. 268-281, Mar 2012.
- MARTENS, E.; DEMAIN, A. L. The antibiotic resistance crisis, with a focus on the United States. **J Antibiot (Tokyo)**, 70, n. 5, p. 520-526, May 2017.
- MARTINEZ, J. L. General principles of antibiotic resistance in bacteria. **Drug Discov Today Technol**, 11, p. 33-39, Mar 2014.
- MCADOW, M.; KIM, H. K.; DEDENT, A. C.; HENDRICKX, A. P. *et al.* Preventing *Staphylococcus aureus* sepsis through the inhibition of its agglutination in blood. **PLoS Pathog**, 7, n. 10, p. e1002307, Oct 2011.
- MELANDER, R. J.; BASAK, A. K.; MELANDER, C. Natural products as inspiration for the development of bacterial antibiofilm agents. **Nat Prod Rep**, 37, n. 11, p. 1454-1477, 11 01 2020.
- MISHRA, R.; PANDA, A. K.; DE MANDAL, S.; SHAKEEL, M. *et al.* Natural Anti-biofilm Agents: Strategies to Control Biofilm-Forming Pathogens. **Front Microbiol**, 11, p. 566325, 2020.
- MONTEIRO, C.; COSTA, F.; PIRTTILÄ, A. M.; TEJESVI, M. V. *et al.* Prevention of urinary catheter-associated infections by coating antimicrobial peptides from crowberry endophytes. **Sci Rep**, 9, n. 1, p. 10753, 07 24 2019.
- MOORMEIER, D. E.; BAYLES, K. W. *Staphylococcus aureus* biofilm: a complex developmental organism. **Mol Microbiol**, 104, n. 3, p. 365-376, May 2017.
- MORADALI, M. F.; GHODS, S.; REHM, B. H. Lifestyle: A Paradigm for Adaptation, Survival, and Persistence. **Front Cell Infect Microbiol**, 7, p. 39, 2017.
- MUNITA, J. M.; ARIAS, C. A. Mechanisms of Antibiotic Resistance. **Microbiol Spectr**, 4, n. 2, 04 2016.
- MÜHLEN, S.; DERSCH, P. Anti-virulence Strategies to Target Bacterial Infections. **Curr Top Microbiol Immunol**, 398, p. 147-183, 2016.
- NAIK, D. N.; WAHIDULLAH, S.; MEENA, R. M. Attenuation of *Pseudomonas aeruginosa* virulence by marine invertebrate-derived *Streptomyces* sp. **Lett Appl Microbiol**, 56, n. 3, p. 197-207, Mar 2013.
- NAKONIECZNA, J.; MICHTA, E.; RYBICKA, M.; GRINHOLC, M. *et al.* Superoxide dismutase is upregulated in *Staphylococcus aureus* following protoporphyrin-mediated

photodynamic inactivation and does not directly influence the response to photodynamic treatment. **BMC Microbiol**, 10, p. 323, Dec 2010.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural Products as Sources of New Drugs from 1981 to 2014. **J Nat Prod**, 79, n. 3, p. 629-661, Mar 25 2016.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural Products as Sources of New Drugs over the Nearly Four Decades from 01/1981 to 09/2019. **J Nat Prod**, 83, n. 3, p. 770-803, 03 27 2020.

NGUYEN, F.; STAROSTA, A. L.; ARENZ, S.; SOHMEN, D. *et al.* Tetracycline antibiotics and resistance mechanisms. **Biol Chem**, 395, n. 5, p. 559-575, May 2014.

NICOLAS, I.; BORDEAU, V.; BONDON, A.; BAUDY-FLOCH, M. *et al.* Novel antibiotics effective against gram-positive and -negative multi-resistant bacteria with limited resistance. **PLoS Biol**, 17, n. 7, p. e3000337, 07 2019.

NITHYA, C.; BEGUM, M. F.; PANDIAN, S. K. Marine bacterial isolates inhibit biofilm formation and disrupt mature biofilms of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. **Appl Microbiol Biotechnol**, 88, n. 1, p. 341-358, Sep 2010.

NIU, C.; YU, D.; WANG, Y.; REN, H. *et al.* Common and pathogen-specific virulence factors are different in function and structure. **Virulence**, 4, n. 6, p. 473-482, Aug 2013.

NIU, S.; LI, S.; CHEN, Y.; TIAN, X. *et al.* Lobophorins E and F, new spirotetronate antibiotics from a South China Sea-derived *Streptomyces* sp. SCSIO 01127. **J Antibiot (Tokyo)**, 64, n. 11, p. 711-716, Nov 2011.

NUNES, S. O.; ROSA, H. D. S.; CANELLAS, A. L. B.; ROMANOS, M. T. V. *et al.* High reduction of staphylococcal biofilm by aqueous extract from marine sponge-isolated *Enterobacter* sp. **Res Microbiol**, 172, n. 1, p. 103787, 2021 Jan-Feb 2021.

O'KEEFE, B. R. Biologically active proteins from natural product extracts. **J Nat Prod**, 64, n. 10, p. 1373-1381, Oct 2001.

O'NEILL, J. Review on Antimicrobial Resistance Antimicrobial Resistance: Tackling a crisis for the health and wealth of nations. **London: Review on Antimicrobial Resistance**. 2014. Available from: https://amr-review.org/sites/default/files/AMR%20Review%20Paper%20-%20Tackling%20a%20crisis%20for%20the%20health%20and%20wealth%20of%20nations_1.pdf

ORGANIZATION, W. H. **Global priority list of antibiotic-resistant bacteria to guide research, discovery, and development of new antibiotics**, 2017. Disponível em: https://www.who.int/medicines/publications/WHO-PPL-Short_Summary_25Feb-ET_NM_WHO.pdf.

ORTIZ, A.; SANSINENEA, E. Chemical Compounds Produced by *Bacillus* sp. Factories and Their Role in Nature. **Mini Rev Med Chem**, 19, n. 5, p. 373-380, 2019.

OTTO, M. *Staphylococcus epidermidis*--the 'accidental' pathogen. **Nat Rev Microbiol**, 7, n. 8, p. 555-567, Aug 2009.

OTTO, M. *Staphylococcus epidermidis* pathogenesis. **Methods Mol Biol**, 1106, p. 17-31, 2014.

OTTO, M. Staphylococcal Biofilms. **Microbiol Spectr**, 6, n. 4, 08 2018.

PAHARIK, A. E.; HORSWILL, A. R. The Staphylococcal Biofilm: Adhesins, Regulation, and Host Response. **Microbiol Spectr**, 4, n. 2, 04 2016.

PALMER, J.; FLINT, S.; BROOKS, J. Bacterial cell attachment, the beginning of a biofilm. **J Ind Microbiol Biotechnol**, 34, n. 9, p. 577-588, Sep 2007.

PALOMO, S.; GONZÁLEZ, I.; DE LA CRUZ, M.; MARTÍN, J. *et al.* Sponge-derived Kocuria and *Micrococcus* spp. as sources of the new thiazolyl peptide antibiotic kocurin. **Mar Drugs**, 11, n. 4, p. 1071-1086, Mar 28 2013.

PAN, H. Q.; ZHANG, S. Y.; WANG, N.; LI, Z. L. *et al.* New spiro-tetronate antibiotics, lobophorins H and I, from a South China Sea-derived *Streptomyces* sp. 12A35. **Mar Drugs**, 11, n. 10, p. 3891-3901, Oct 15 2013.

PANG, Z.; RAUDONIS, R.; GLICK, B. R.; LIN, T. J. *et al.* Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: mechanisms and alternative therapeutic strategies. **Biotechnol Adv**, 37, n. 1, p. 177-192, 2019 Jan - Feb 2019.

PANTOSTI, A.; SANCHINI, A.; MONACO, M. Mechanisms of antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus*. **Future Microbiol**, 2, n. 3, p. 323-334, Jun 2007.

PAPA, R.; ARTINI, M.; CELLINI, A.; TILOTTA, M. *et al.* A new anti-infective strategy to reduce the spreading of antibiotic resistance by the action on adhesion-mediated virulence factors in *Staphylococcus aureus*. **Microb Pathog**, 63, p. 44-53, Oct 2013.

PARK, J. H.; LEE, J. H.; CHO, M. H.; HERZBERG, M. *et al.* Acceleration of protease effect on *Staphylococcus aureus* biofilm dispersal. **FEMS Microbiol Lett**, 335, n. 1, p. 31-38, Oct 2012.

PARK, J. H.; LEE, J. H.; KIM, C. J.; LEE, J. C. *et al.* Extracellular protease in Actinomycetes culture supernatants inhibits and detaches *Staphylococcus aureus* biofilm formation. **Biotechnol Lett**, 34, n. 4, p. 655-661, Apr 2012.

PERIASAMY, S.; JOO, H. S.; DUONG, A. C.; BACH, T. H. *et al.* How *Staphylococcus aureus* biofilms develop their characteristic structure. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 109, n. 4, p. 1281-1286, Jan 24 2012.

PETTIT, G. R.; KNIGHT, J. C.; HERALD, D. L.; PETTIT, R. K. *et al.* Antineoplastic agents. 570. Isolation and structure elucidation of bacillistatins 1 and 2 from a marine *Bacillus silvestris*. **J Nat Prod**, 72, n. 3, p. 366-371, Mar 2009.

PINTO, H. B.; BRUST, F. R.; MACEDO, A. J.; TRENTIN, D. S. The antivirulence compound myricetin possesses remarkable synergistic effect with antibacterials upon multidrug resistant *Staphylococcus aureus*. **Microb Pathog**, 149, p. 104571, Dec 2020.

PROKSCH, P.; EDRADA, R. A.; EBEL, R. Drugs from the seas - current status and microbiological implications. **Appl Microbiol Biotechnol**, 59, n. 2-3, p. 125-134, Jul 2002.

RABIN, N.; ZHENG, Y.; OPOKU-TEMENG, C.; DU, Y. *et al.* Biofilm formation mechanisms and targets for developing antibiofilm agents. **Future Med Chem**, 7, n. 4, p. 493-512, 2015.

RAJASABAPATHY, R.; GHADI, S. C.; MANIKANDAN, B.; MOHANDASS, C. *et al.* Antimicrobial profiling of coral reef and sponge associated bacteria from southeast coast of India. **Microb Pathog**, 141, p. 103972, Apr 2020.

RAMOS, E. R.; REITZEL, R.; JIANG, Y.; HACHEM, R. Y. *et al.* Clinical effectiveness and risk of emerging resistance associated with prolonged use of antibiotic-impregnated catheters: more than 0.5 million catheter days and 7 years of clinical experience. **Crit Care Med**, 39, n. 2, p. 245-251, Feb 2011.

RANDALL, C. P.; MARINER, K. R.; CHOPRA, I.; O'NEILL, A. J. The target of daptomycin is absent from *Escherichia coli* and other gram-negative pathogens. **Antimicrob Agents Chemother**, 57, n. 1, p. 637-639, Jan 2013.

RASKO, D. A.; SPERANDIO, V. Anti-virulence strategies to combat bacteria-mediated disease. **Nat Rev Drug Discov**, 9, n. 2, p. 117-128, Feb 2010.

RAUSCH, M.; DEISINGER, J. P.; ULM, H.; MÜLLER, A. *et al.* Coordination of capsule assembly and cell wall biosynthesis in *Staphylococcus aureus*. **Nat Commun**, 10, n. 1, p. 1404, 03 2019.

RENDUELES, O.; KAPLAN, J. B.; GHIGO, J. M. Antibiofilm polysaccharides. **Environ Microbiol**, 15, n. 2, p. 334-346, Feb 2013.

RIYANTI; BALANSA, W.; LIU, Y.; SHARMA, A. *et al.* Selection of sponge-associated bacteria with high potential for the production of antibacterial compounds. **Sci Rep**, 10, n. 1, p. 19614, 11 12 2020.

RODRIGUES, T.; REKER, D.; SCHNEIDER, P.; SCHNEIDER, G. Counting on natural products for drug design. **Nat Chem**, 8, n. 6, p. 531-541, 06 2016.

ROMANO, G.; COSTANTINI, M.; SANSONE, C.; LAURITANO, C. *et al.* Marine microorganisms as a promising and sustainable source of bioactive molecules. **Mar Environ Res**, 128, p. 58-69, Jul 2017.

ROY, R.; TIWARI, M.; DONELLI, G.; TIWARI, V. Strategies for combating bacterial biofilms: A focus on anti-biofilm agents and their mechanisms of action. **Virulence**, 9, n. 1, p. 522-554, 01 2018.

RUMBAUGH, K. P.; SAUER, K. Biofilm dispersion. **Nat Rev Microbiol**, 18, n. 10, p. 571-586, 10 2020.

SABATÉ BRESCÓ, M.; HARRIS, L. G.; THOMPSON, K.; STANIC, B. *et al.* Pathogenic Mechanisms and Host Interactions in. **Front Microbiol**, 8, p. 1401, 2017.

SACRISTÁN-SORIANO, O.; BANAIGS, B.; CASAMAYOR, E. O.; BECERRO, M. A. Exploring the links between natural products and bacterial assemblages in the sponge *Aplysina aerophoba*. **Appl Environ Microbiol**, 77, n. 3, p. 862-870, Feb 2011.

- SAGAR, S.; KAUR, M.; MINNEMAN, K. P. Antiviral lead compounds from marine sponges. **Mar Drugs**, 8, n. 10, p. 2619-2638, Oct 11 2010.
- SANTAJIT, S.; INDRAWATTANA, N. Mechanisms of Antimicrobial Resistance in ESKAPE Pathogens. **Biomed Res Int**, 2016, p. 2475067, 2016.
- SANTOS, O. C.; PONTES, P. V.; SANTOS, J. F.; MURICY, G. *et al.* Isolation, characterization and phylogeny of sponge-associated bacteria with antimicrobial activities from Brazil. **Res Microbiol**, 161, n. 7, p. 604-612, Sep 2010.
- SANTOS, O. C. S.; SOARES, A. R.; MACHADO, F. L. S.; ROMANOS, M. T. V. *et al.* Investigation of biotechnological potential of sponge-associated bacteria collected in Brazilian coast. **Lett Appl Microbiol**, 60, n. 2, p. 140-147, Feb 2015.
- SAYEM, S. M.; MANZO, E.; CIAVATTA, L.; TRAMICE, A. *et al.* Anti-biofilm activity of an exopolysaccharide from a sponge-associated strain of *Bacillus licheniformis*. **Microb Cell Fact**, 10, p. 74, Sep 2011.
- SCHULZE, A.; MITTERER, F.; POMBO, J. P.; SCHILD, S. Biofilms by bacterial human pathogens: Clinical relevance - development, composition and regulation - therapeutical strategies. **Microb Cell**, 8, n. 2, p. 28-56, Feb 2021.
- SCOPEL, M.; ABRAHAM, W. R.; HENRIQUES, A. T.; MACEDO, A. J. Dipeptide cis-cyclo(Leucyl-Tyrosyl) produced by sponge associated *Penicillium* sp. F37 inhibits biofilm formation of the pathogenic *Staphylococcus epidermidis*. **Bioorg Med Chem Lett**, 23, n. 3, p. 624-626, Feb 01 2013.
- SHINDE, P.; BANERJEE, P.; MANDHARE, A. Marine natural products as source of new drugs: a patent review (2015-2018). **Expert Opin Ther Pat**, 29, n. 4, p. 283-309, 04 2019.
- SILVA, L. N.; ZIMMER, K. R.; MACEDO, A. J.; TRENTIN, D. S. Plant Natural Products Targeting Bacterial Virulence Factors. **Chem Rev**, 116, n. 16, p. 9162-9236, Aug 2016.
- SIMPKIN, V. L.; RENWICK, M. J.; KELLY, R.; MOSSIALOS, E. Incentivising innovation in antibiotic drug discovery and development: progress, challenges and next steps. **J Antibiot (Tokyo)**, 70, n. 12, p. 1087-1096, Dec 2017.
- SKARIYACHAN, S.; CHALLAPILLI, S. B.; PACKIRISAMY, S.; SRIDHAR, V. S. *et al.* Monitoring and assessment of the therapeutic impact of metabolites extracted from sponge-associated bacteria screened from Gulf of Mannar, southeast coast of India. **Environ Monit Assess**, 192, n. 4, p. 241, Mar 18 2020.
- SOLANKI, V.; TIWARI, M.; TIWARI, V. Host-bacteria interaction and adhesin study for development of therapeutics. **Int J Biol Macromol**, 112, p. 54-64, Jun 2018.
- SONG, B.; WANG, Y. Z.; WANG, G. Y.; LIU, G. L. *et al.* The lipopeptide 6-2 produced by *Bacillus amyloliquefaciens* anti-CA has potent activity against the biofilm-forming organisms. **Mar Pollut Bull**, 108, n. 1-2, p. 62-69, Jul 15 2016.
- SONG, Y.; HUANG, H.; CHEN, Y.; DING, J. *et al.* Cytotoxic and antibacterial marfuraquinocins from the deep South China Sea-derived *Streptomyces niveus* SCSIO 3406. **J Nat Prod**, 76, n. 12, p. 2263-2268, Dec 27 2013.

- SONG, Y.; LI, Q.; LIU, X.; CHEN, Y. *et al.* Cyclic Hexapeptides from the Deep South China Sea-Derived *Streptomyces scopuliridis* SCSIO ZJ46 Active Against Pathogenic Gram-Positive Bacteria. **J Nat Prod**, 77, n. 8, p. 1937-1941, Aug 22 2014.
- STONES, D. H.; KRACHLER, A. M. Fatal attraction: how bacterial adhesins affect host signaling and what we can learn from them. **Int J Mol Sci**, 16, n. 2, p. 2626-2640, Jan 2015.
- SUBRAMENIUM, G. A.; SWETHA, T. K.; IYER, P. M.; BALAMURUGAN, K. *et al.* 5-hydroxymethyl-2-furaldehyde from marine bacterium *Bacillus subtilis* inhibits biofilm and virulence of *Candida albicans*. **Microbiol Res**, 207, p. 19-32, Mar 2018.
- TACCONELLI, E.; CARRARA, E.; SAVOLDI, A.; HARBARTH, S. *et al.* Discovery, research, and development of new antibiotics: the WHO priority list of antibiotic-resistant bacteria and tuberculosis. **Lancet Infect Dis**, 18, n. 3, p. 318-327, 03 2018.
- TAREQ, F. S.; KIM, J. H.; LEE, M. A.; LEE, H. S. *et al.* Antimicrobial gageomacrolactins characterized from the fermentation of the marine-derived bacterium *Bacillus subtilis* under optimum growth conditions. **J Agric Food Chem**, 61, n. 14, p. 3428-3434, Apr 2013.
- TAYLOR, M. W.; RADAX, R.; STEGER, D.; WAGNER, M. Sponge-associated microorganisms: evolution, ecology, and biotechnological potential. **Microbiol Mol Biol Rev**, 71, n. 2, p. 295-347, Jun 2007.
- TENOVER, F. C. Mechanisms of antimicrobial resistance in bacteria. **Am J Infect Control**, 34, n. 5 Suppl 1, p. S3-10; discussion S64-73, Jun 2006.
- THI, M. T. T.; WIBOWO, D.; REHM, B. H. A. *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms. **Int J Mol Sci**, 21, n. 22, Nov 17 2020.
- THOMAS, T. R.; KAVLEKAR, D. P.; LOKABHARATHI, P. A. Marine drugs from sponge-microbe association--a review. **Mar Drugs**, 8, n. 4, p. 1417-1468, Apr 2010.
- TOLKER-NIELSEN, T. Biofilm Development. **Microbiol Spectr**, 3, n. 2, p. MB-0001-2014, Apr 2015.
- TORTORELLA, E.; TEDESCO, P.; PALMA ESPOSITO, F.; JANUARY, G. G. *et al.* Antibiotics from Deep-Sea Microorganisms: Current Discoveries and Perspectives. **Mar Drugs**, 16, n. 10, Sep 29 2018.
- TUFFS, S. W.; JAMES, D. B. A.; BESTEBROER, J.; RICHARDS, A. C. *et al.* The *Staphylococcus aureus* superantigen SEIX is a bifunctional toxin that inhibits neutrophil function. **PLoS Pathog**, 13, n. 9, p. e1006461, Sep 2017.
- VAIKUNDAMOORTHY, R.; RAJENDRAN, R.; SELVARAJU, A.; MOORTHY, K. *et al.* Development of thermostable amylase enzyme from *Bacillus cereus* for potential antibiofilm activity. **Bioorg Chem**, 77, p. 494-506, 04 2018.
- VENTOLA, C. L. The antibiotic resistance crisis: part 1: causes and threats. **P T**, 40, n. 4, p. 277-283, Apr 2015.
- VIELA, F.; MATHELIÉ-GUINLET, M.; VILJOEN, A.; DUFRÊNE, Y. F. What makes bacterial pathogens so sticky? **Mol Microbiol**, 113, n. 4, p. 683-690, 04 2020.

VISANSIRIKUL, S.; KOLODZIEJ, S. A.; DEMCHENKO, A. V. *Staphylococcus aureus* capsular polysaccharides: a structural and synthetic perspective. **Org Biomol Chem**, 18, n. 5, p. 783-798, 02 2020.

VISZWAPRIYA, D.; PRITHIKA, U.; DEEBIKA, S.; BALAMURUGAN, K. *et al.* *In vitro* and *in vivo* antibiofilm potential of 2,4-Di-tert-butylphenol from seaweed surface associated bacterium *Bacillus subtilis* against group A streptococcus. **Microbiol Res**, 191, p. 19-31, Oct 2016.

WEBSTER, N. S.; TAYLOR, M. W. Marine sponges and their microbial symbionts: love and other relationships. **Environ Microbiol**, 14, n. 2, p. 335-346, Feb 2012.

WILSON, D. N. Ribosome-targeting antibiotics and mechanisms of bacterial resistance. **Nat Rev Microbiol**, 12, n. 1, p. 35-48, Jan 2014.

WOHLLEBEN, W.; MAST, Y.; STEGMANN, E.; ZIEMERT, N. Antibiotic drug discovery. **Microb Biotechnol**, 9, n. 5, p. 541-548, 09 2016.

WRIGHT, G. D. Something old, something new: revisiting natural products in antibiotic drug discovery. **Can J Microbiol**, 60, n. 3, p. 147-154, Mar 2014.

WU, S. C.; LIU, F.; ZHU, K.; SHEN, J. Z. Natural Products That Target Virulence Factors in Antibiotic-Resistant. **J Agric Food Chem**, 67, n. 48, p. 13195-13211, Dec 2019.

WU, S.; LIU, G.; ZHANG, D.; LI, C. *et al.* Purification and biochemical characterization of an alkaline protease from marine bacteria *Pseudoalteromonas* sp. 129-1. **J Basic Microbiol**, 55, n. 12, p. 1427-1434, Dec 2015.

XIE, Y.; PENG, Q.; JI, Y.; XIE, A. *et al.* Isolation and Identification of Antibacterial Bioactive Compounds From. **Front Microbiol**, 12, p. 645484, 2021.

XUE, T.; ZHAO, L.; SUN, B. LuxS/AI-2 system is involved in antibiotic susceptibility and autolysis in *Staphylococcus aureus* NCTC 8325. **Int J Antimicrob Agents**, 41, n. 1, p. 85-89, Jan 2013.

YIN, J.; MENG, Q.; CHENG, D.; FU, J. *et al.* Mechanisms of bactericidal action and resistance of polymyxins for Gram-positive bacteria. **Appl Microbiol Biotechnol**, 104, n. 9, p. 3771-3780, May 2020.

ZHANG, L.; AN, R.; WANG, J.; SUN, N. *et al.* Exploring novel bioactive compounds from marine microbes. **Curr Opin Microbiol**, 8, n. 3, p. 276-281, Jun 2005.

ZHANG, W.; LI, C. Exploiting Quorum Sensing Interfering Strategies in Gram-Negative Bacteria for the Enhancement of Environmental Applications. **Front Microbiol**, 6, p. 1535, 2015.

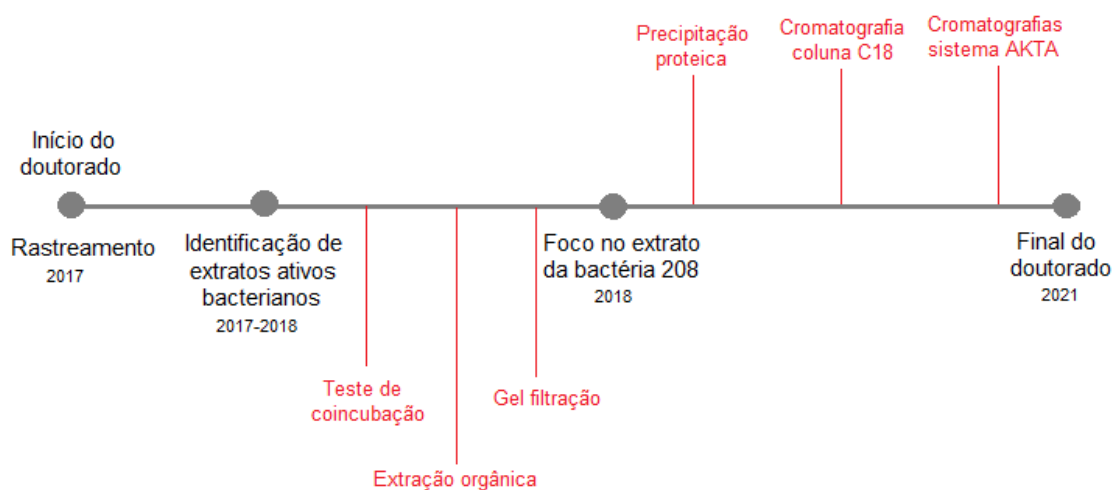
ZHANG, Y.; ADNANI, N.; BRAUN, D. R.; ELLIS, G. A. *et al.* Micromonohalimanes A and B: Antibacterial Halimane-Type Diterpenoids from a Marine Micromonospora Species. **J Nat Prod**, 79, n. 11, p. 2968-2972, 11 23 2016.

ZHAO, L.; XUE, T.; SHANG, F.; SUN, H. *et al.* *Staphylococcus aureus* AI-2 quorum sensing associates with the KdpDE two-component system to regulate capsular polysaccharide synthesis and virulence. **Infect Immun**, 78, n. 8, p. 3506-3515, Aug 2010.

ZHOU, S. Y.; HU, Y. J.; MENG, F. C.; QU, S. Y. *et al.* Bacillamidins A-G from a Marine-Derived. **Mar Drugs**, 16, n. 9, Sep 11 2018.

ZHOU, X.; HUANG, H.; CHEN, Y.; TAN, J. *et al.* Marthiapeptide A, an anti-infective and cytotoxic polythiazole cyclopeptide from a 60 L scale fermentation of the deep sea-derived *Marinactinospora thermotolerans* SCSIO 00652. **J Nat Prod**, 75, n. 12, p. 2251-2255, Dec 28 2012.

Apêndice destinado para a descrição de métodos experimentais realizados ao longo do período de doutorado (2017-2021) que não foram incluídos nos capítulos I e II. A ordem desses experimentos (destacados em vermelho) segue a linha do tempo exibida abaixo.



1. SISTEMA DE COINCUBAÇÃO

Pelo fato de o extrato bruto (menor do que 10 kDa) da bactéria BMPV 40 (identificada como *Vibrio alginolyticus*) ter apresentado atividade antibiótica significativa contra *P. aeruginosa*, com uma inibição de 40% no seu crescimento, durante a etapa de rastreamento de moléculas, realizou-se a coincubação da BMPV 40 com a presença de *P. aeruginosa* (PA) morta por calor (*heat killed*, HK) exposta à uma temperatura de 60° C por 30 min, visando estimular mais a produção de metabólitos da bactéria marinha contra essa cepa patogênica. A técnica de coincubação já foi relatada como um dos mais eficazes métodos para estimular a produção de metabólitos secundários, já que essas moléculas são produzidas como mecanismo de defesa contra outros microrganismos, estimulando também a produção de compostos novos ou raros, não encontrados em cultivos puros. Além disso, essa produção pode ser direcionada quando incubados com patógenos alvo (KIM; LEE; HWANG; KIM *et al.*, 2021).

Para isso, foi realizado um teste piloto no qual adicionou-se em um Erlenmeyer: 90 mL de meio marinho líquido, 9 mL de inóculo bacteriano da BMPV ($OD \pm 0,500_{nm}$) em salina e 1 mL de *P. aeruginosa* morta por calor (PA HK), com uma OD de $\pm 0,150$. O sistema foi incubado em *shaker* (150 rpm) à 28° C por 24 h. Nenhum inóculo bacteriano foi adicionado na condição controle e uma terceira condição sem a presença de PA HK (apenas com BMPV 40) também foi inoculada. Após, centrifugou-se os fermentados (10.000 rpm por 40 min à 4° C). O filtrado bruto foi então fracionado com o auxílio de um ultrafiltro de 10 kDa, e os compostos que passaram pelo o filtro foram utilizados para o teste de antiformação de biofilme contra *P. aeruginosa* através da técnica de cristal violeta como descrito previamente. A coincubação de BMPV 40 com PA HK não estimulou o aumento da atividade antibiótica contra a bactéria Gram-negativa (Figura A), resultando no abandono da metodologia.

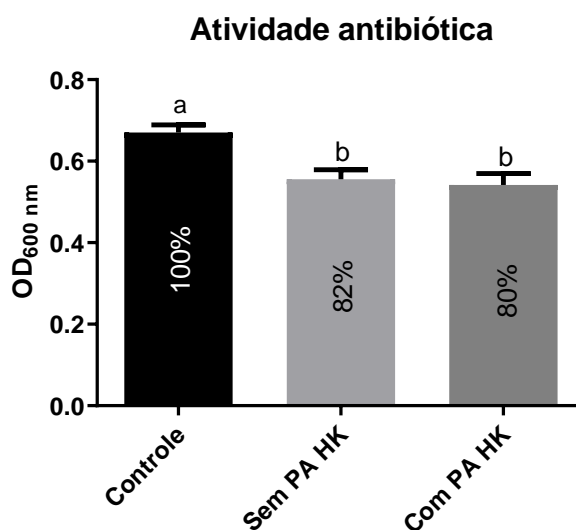


Figura A: Coincubação entre BMPV 40 e *Pseudomonas aeruginosa* morta por calor (*heat-killed* - HK) e a ação antibiótica de metabólitos secundários produzidos por essa bactéria marinha contra *P. aeruginosa*. BMPV 40 foi fermentado com a presença ou ausência de *P. aeruginosa* morta por calor (PA HK) por 24 h à 28° C e 150 rpm. Controle com salina foi considerado 100% de crescimento bacteriano. As barras pretas representam o desvio padrão ($\pm DP$) das replicatas biológicas. As diferentes letras representam diferenças estatísticas significativas ($p < 0,0001$) através do teste *one-way* ANOVA e pós-teste de *Dunnnett*.

2. EXTRAÇÃO

A extração com acetato de etila do fermentado bruto de 72 h produzido pela bactéria marinha BMPV Mel (*Bacillus stratosphericus*) foi realizado com o objetivo de separar os compostos em duas frações: aquosa e orgânica. Essa metodologia seguiu o protocolo já descrito por Wu *et al.*, (2014) com modificações (WU; OESKER; WIESE; SCHMALJOHANN *et al.*, 2014). Para isso, a bactéria marinha (100 mL em meio marinho) foi fermentada por 72 horas à 28° C e 150 rpm. 50 mL do extrato bruto foi misturado com 50 mL de acetato de etila absoluto (proporção 1:1) e as fases aquosa e orgânica foram separadas. O composto orgânico foi então evaporado e a amostra resultante posteriormente liofilizada. A fração aquosa também foi liofilizada e ambas frações (0,1 mg/mL) foram testadas para atividade antibiótica contra *P. aeruginosa*. Nenhuma fração apresentou atividade (dados não mostrados).

3. CROMATOGRAFIA GEL FILTRAÇÃO

Fermentado de 24 h da Bactéria 208 (*Priestia* sp.), após ser filtrado com ultrafiltro de 10 kDa (Millipore), foi fracionado através de cromatografia de gel-filtração com a coluna Sephadex G-10 (GE Healthcare), utilizada para purificar peptídeos. Foram adicionados 800 µL de filtrado (70 µg/mL) na coluna. 24 frações de 2 mL cada foram coletadas e testadas para atividade de inibição do biofilme de *S. aureus* Newman. Nenhuma fração apresentou uma atividade evidente, visto que a fração 16 (com maior atividade) diminuiu apenas 15% da estrutura analisada (Figura B).

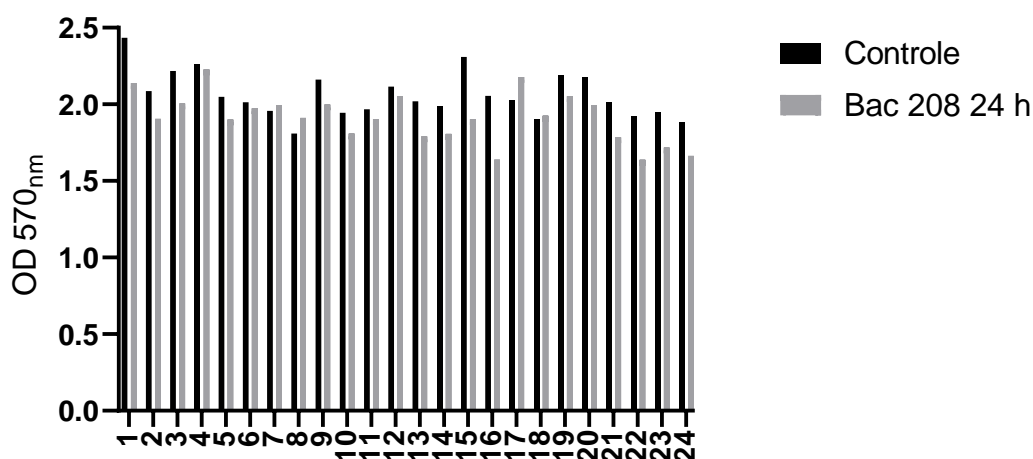


Figura B: Teste de antiformação de biofilme contra *S. aureus* com frações oriundas de cromatografia de gel-filtração. Extrato menor que 10 kDa do fermentado 24 h da bactéria 208 (Bac 208) teve atividade antiformação de biofilme testada contra *S. aureus* Newman após ser fracionado por uma coluna Sephadex G-10 de gel filtração. Amostra foi substituída por salina na condição controle. Apenas uma replicata técnica e biológica foi realizada.

Entretanto, optou-se por juntar as frações que apresentaram uma leve atividade e realizar o teste de antiformação de biofilme novamente. Dessa forma, as seguintes frações foram unidas: a) frações 1, 2 e 3 (denominada Fração 1); b) frações 13, 14, 15 (denominada fração 2) e c) 16; frações 17, 18 e 19 (denominada fração 3). Não foi detectado qualquer tipo de bioatividade contra *S. aureus* Newman (Figura C).

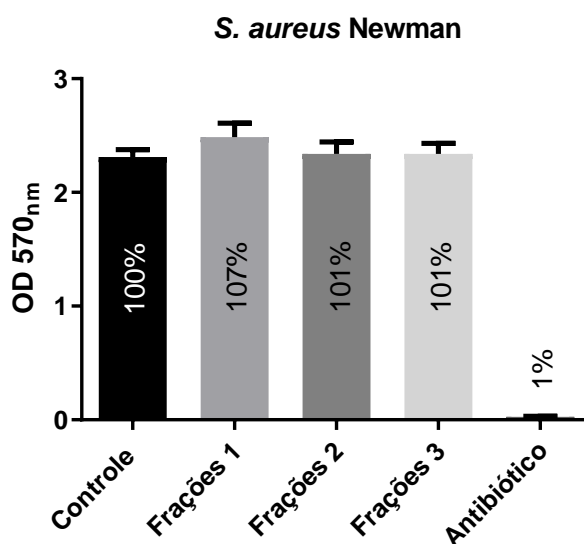


Figura C: Frações 1, 2 e 3 oriundas de cromatografia de gel filtração contra biofilme de *S. aureus*. Extrato menor que 10 kDa do fermentado 24 h da bactéria 208 (Bac 208) foi separado com uma coluna Sephadex G-10 de gel filtração, gerando 24 frações. Dessas, uniu-se as frações 1, 2 e 3, (denominada Fração 1); 13, 14, 15 e 16 (denominada Fração 2); 17, 18 e 19 (denominada Fração 3). O teste foi realizado em triplicata biológica (barras

pretas representam o desvio padrão) e analisado estatisticamente através do teste de one-way ANOVA com pós-teste de Tukey. Controle com salina foi considerado 100% de crescimento de biofilme e o antibiótico utilizado como controle antimicrobiano foi a vancomicina (8 µg/mL).

4. PRECIPITAÇÃO PROTEICA

Após a constatação de que o composto ativo produzido pelo extrato da bactéria 208 tinha origem proteica, dois protocolos de precipitação de proteína foram testados: precipitação com ácido tricloroacético (TCA 10%) e com sulfato de amônio (*salting-out*) com saturação inicial de 80%. A precipitação com sulfato de amônio mostrou-se mais eficaz devido a evidente banda proteica em destaque no gel de Tri-Tricina SDS, desenvolvido segundo protocolo de SCHÄGGER (2006) (Figura DI), além de possibilitar a realização de testes biológicos após a precipitação, diferentemente do TCA 10%, que cliva ligações de hidrogênio desfazendo a estrutura secundária da proteína, ou seja, desnaturando-a (KOONTZ, 2014).

Posteriormente, testou-se diferentes saturações com o sal (20, 40, 60 e 80%) para averiguar qual a melhor quantidade de sulfato de amônio para precipitar a proteína ativa - de acordo com a metodologia previamente descrita por DUONG-LY; GABELLI (2014) -, e concluiu-se que a saturação ideal era de 60%, visto que uma forte atividade antif formação contra *S. aureus* foi observada (Figura DII). Além disso, a saturação 80% apresentou uma solubilidade reduzida.

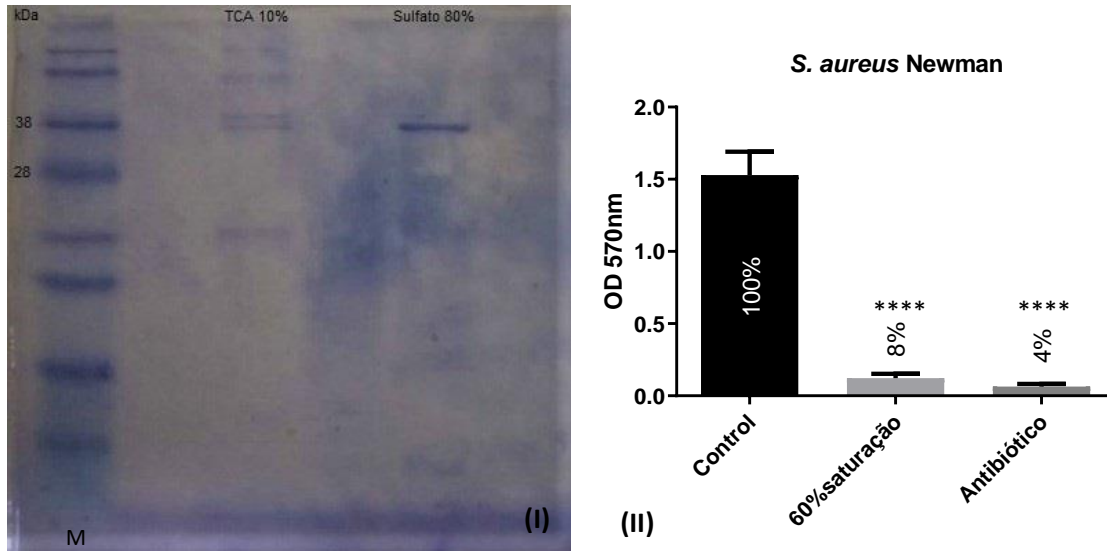


Figura D: Precipitação de proteínas oriundas do extrato parcialmente fracionado de *Priestia* sp (bactéria 208). (a) Extrato bruto da bactéria marinha 208 teve suas proteínas precipitadas através do uso de ácido tricloroacético (10%) e sulfato de amônio (saturação de 80%); (b) Formação de biofilme de *S. aureus* após a incubação com proteínas do extrato da bactéria marinha 208 precipitadas (60% saturação com sulfato de amônio) e dessalinizadas. O teste de quantificação da formação do biofilme foi realizado em duplicata biológica (barras pretas indicam o desvio padrão) e analisado estatisticamente através do teste de teste t *Student* (**** $p < 0,0001$). Controle com salina foi considerado 100% de crescimento de biofilme e o antibiótico utilizado como controle antimicrobiano foi a vancomicina (8 $\mu\text{g}/\text{mL}$). M: marcador de passo padrão.

Após o desenvolvimento de um protocolo padrão para isolar parcialmente a proteína ativa, no qual incluiu: (a) fracionamento com ultrafiltros (30 e 10 kDa), (b) precipitação com 60% de saturação com sulfato de amônio, (c) dessalinização com membrana semipermeável (Pur-A-Lyzer Midi 6000 Dialysis Kit, Sigma) e (d) quantificação de proteína por kit BCA Protein Assay (Pierce), a amostra passou a ser denominada de *partial purified protein* (PPP). A partir dessa amostra, realizou-se um gel de Tricina SDS-PAGE (concentração proteica de 1 mg/mL) que foi corado com *Coomassie blue* ou nitrato de prata. O padrão de bandas proteicas foi mais evidente quando corado com nitrato de prata, comparado com a coloração de *Coomassie blue* (Figura E).

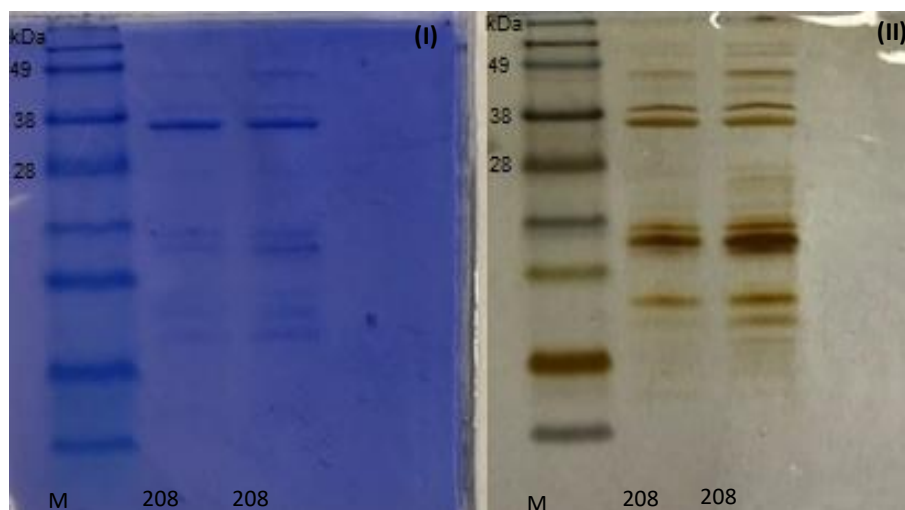


Figura E: Padrão proteico referente ao extrato da bactéria 208 (tamanho entre 30 e 10 kDa) após precipitação com 60% de saturação de sulfato de amônio. (I) proteínas coradas com *Coomassie blue*; (II) bandas coradas com nitrato de prata. M: marcador de peso padrão; 208: extrato amostral.

5. CROMATOGRAFIA DE FASE REVERSA

Após verificar a presença de muitas proteínas no gel, diversas cromatografias foram realizadas a fim de isolar a proteína bioativa. Primeiro, cartuchos de coluna C18 Sep-Pak (Waters) de 5 mL – constituída de sílica de fase reversa hidrofóbica- foram carregados com 132 µg/mL de PPP e concentrações crescentes de metanol absoluto (5, 10, 15, 20, 30, 50, 70, 85, 100%) e 100% de acetonitrila foram utilizados para eluir as proteínas da coluna. Foram geradas 10 frações de 1 mL cada, sendo que o solvente orgânico foi evaporado e as amostras diluídas em água deionizada para posterior teste de formação de biofilme. Nenhuma atividade foi detectada nas frações analisadas (Figura F).

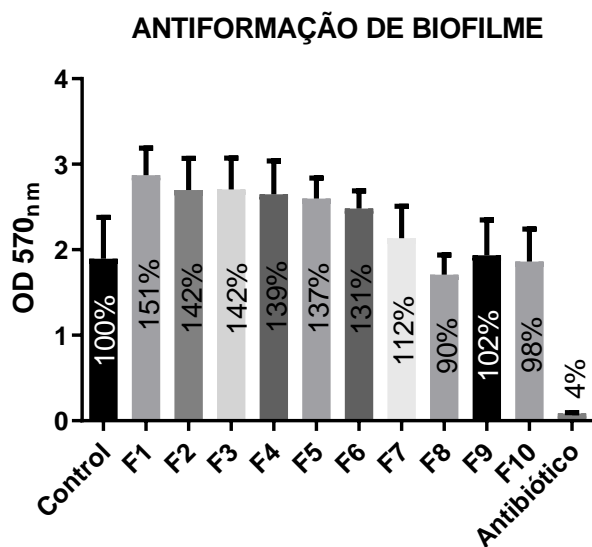


Figura F: Formação de biofilme de *S. aureus* após incubação com frações oriundas do cartucho C18 de fase reversa. O teste de formação de biofilme foi realizado em triplicata biológica e analisado estatisticamente através do teste de *one-way* ANOVA. As barras pretas representam o desvio padrão (\pm DP) entre as replicatas. Controle com salina representa 100% de biofilme formado e o antibiótico utilizado como controle antibiótico foi a vancomicina (8 μ g/mL).

6. AKTA

Através da utilização do sistema automatizado de cromatografia (AKTA Start), conectou-se uma coluna de gel filtração (HiPrep 16/60 Sephacryl S-100, 120 mL) e injetou-se 1 mL de PPP (585,7 μ g/mL) com PBS 10 mM pH 7,0 como eluente. 98 frações de 1 mL foram coletadas e todas elas testadas no ensaio com cristal violeta. Do total, 25 frações apresentaram ação de antiformação do biofilme de *S. aureus* Newman, entretanto o máximo de atividade identificada foi 30% de inibição distribuída em diversas frações (dado não mostrado), o que foi considerado uma baixa atividade comparada com o potencial previamente detectados de 92% de inibição apenas com a precipitação proteica. Esse resultado possivelmente se deve à uma alta diluição amostral propiciada por essa metodologia.

Portanto, optou-se por realizar uma cromatografia de troca iônica. A coluna de escolha inicialmente foi uma catiônica HiTrap SP-Sepharose 5 mL (GE Healthcare), no qual foi carregada com 210 μ g/mL de PPP. 56 frações de 1 mL foram geradas e testadas quanto a sua

capacidade de inibir biofilme de *S. aureus*. Não houve atividade das frações ligadas à coluna (dado não mostrado).

Em seguida, substituiu-se a coluna cromatográfica por uma aniônica HiTrap Q-Sepharose 5 mL (GE Healthcare). Adicionou-se 114,86 µg/mL de PPP na coluna, e utilizou-se como tampões para eluição o tampão A ácido 2-etanossulfônico (MES) 50 mM pH 6,0 e tampão B (MES 50 mM+ 1M NaCl) pH 6,0. O resultado de purificação parcial obtido nesse experimento já foi descrito no Capítulo II.

REFERÊNCIAS

- CHUNG, M.-C.; POPOVA, T. G.; MILLIS, B. A.; MUKHERJEE, D. V. *et al.* Secreted Neutral Metalloproteases of *Bacillus anthracis* as Candidate Pathogenic Factors*. **Journal of Biological Chemistry**, 281, n. 42, p. 31408-31418, 2006/10/20/ 2006.
- DUONG-LY, K. C.; GABELLI, S. B. Salting out of proteins using ammonium sulfate precipitation. **Methods Enzymol**, 541, p. 85-94, 2014.
- KIM, J. H.; LEE, N.; HWANG, S.; KIM, W. *et al.* Discovery of novel secondary metabolites encoded in actinomycete genomes through coculture. **J Ind Microbiol Biotechnol**, 48, n. 3-4, Jun 04 2021.
- KOONTZ, L. TCA precipitation. **Methods Enzymol**, 541, p. 3-10, 2014.
- SCHÄGGER, H. Tricine-SDS-PAGE. **Nat Protoc**, 1, n. 1, p. 16-22, 2006.
- WU, B.; OESKER, V.; WIESE, J.; SCHMALJOHANN, R. *et al.* Two new antibiotic pyridones produced by a marine fungus, *Trichoderma* sp. strain MF106. **Mar Drugs**, 12, n. 3, p. 1208-1219, Mar 06 2014.



BIOTECNOLOGIA MARINHA

Organizadores

Fabiano Thompson & Cristiane Thompson



UFRJ



FURG
UNIVERSIDADE FEDERAL
DO RIO GRANDE



PPG - Mar



ANP



SECIRM



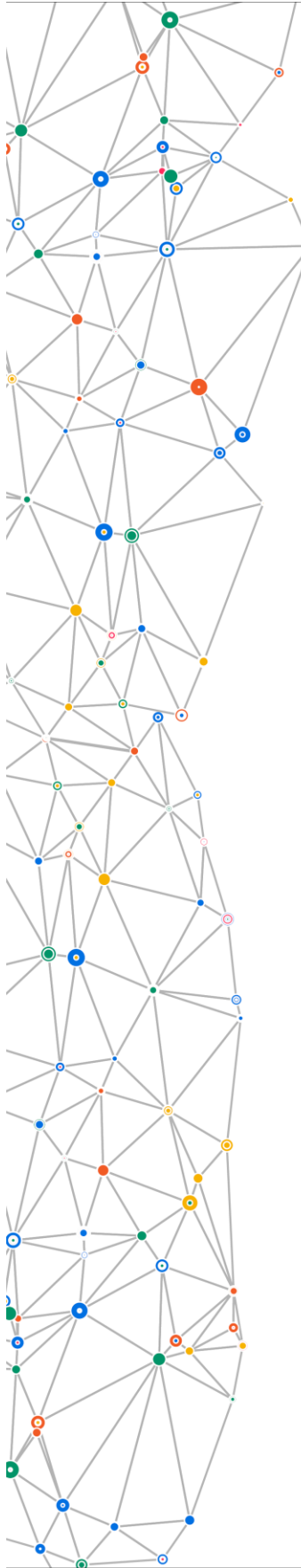
Comissão Interministerial
para os Recursos do Mar

MINISTÉRIO DA
EDUCAÇÃO

MINISTÉRIO DA
**CIÊNCIA, TECNOLOGIA
E INOVAÇÕES**



PÁTRIA AMADA
BRASIL
GOVERNO FEDERAL



ÁCIDOS NUCLEICOS, ANÁLOGOS DE NUCLEOTÍDEOS, MARCADORES E SONDAS MOLECULARES

Nicole Sartori Ribeiro^a
Luciana Angelo Loges^a
Alexandre José Macedo^a

^a Universidade Federal do Rio Grande do Sul

RESUMO

Nos anos 40 descobriu-se que a informação genética estava contida no DNA, mas somente em 1953 James Watson e Francis Crick elucidaram a estrutura dessa macromolécula, bem como o mecanismo de codificação para a produção de proteínas. Desde então vem sendo possível utilizar esses conhecimentos e a tecnologia para fins tão variados quanto o diagnóstico de doenças, a produção de compostos, a identificação de espécies e a prospecção de fármacos a partir de moléculas bioativas, entre outros. Neste capítulo serão discutidos tópicos referentes aos nucleotídeos e nucleosídeos, constituintes fundamentais das moléculas de DNA e RNA, sondas e marcadores moleculares, bem como às ferramentas construídas a partir da biologia molecular, numa abordagem voltada para a riqueza e diversidade do ambiente marinho.

1 | NUCLEOTÍDEOS, SONDAS E MARCADORES MOLECULARES

A palavra biodiversidade possui diversos significados, que variam de acordo com a escala biológica a que se referem. Contudo, um desses conceitos é “todas as espécies que habitam o planeta Terra”, incluindo tanto organismos unicelulares como vírus, bactérias e protistas (ex.: amebas), quanto multicelulares, como plantas, animais e fungos. Todos eles têm seu material genético constituído por ADN (ácido desoxirribonucleico; DNA, *deoxyribonucleic acid*, em inglês) ou ARN (ácido ribonucleico; RNA, *ribonucleic acid*). O DNA e o RNA são macromoléculas essenciais para todas as formas de vida, responsáveis por determinar características genéticas dos seres vivos. Elas são constituídas por nucleotídeos e apresentam imensas variações quando comparadas entre organismos evolutivamente distintos. A diversidade biológica resulta da variação genética entre as espécies, devido aos diferentes ecossistemas que habitam, a variação da comunidade biológica e as interações entre os organismos no ambiente. A biodiversidade é dinâmica na natureza, sendo que as espécies e suas populações continuam a mudar e evoluir devido a processos de diversificação genética, causados por mutações.

Todos os organismos vivos estão sujeitos a mutações devido a interações com o ambiente ou para aperfeiçoar o funcionamento normal das células. Essas alterações genéticas variam desde a troca de um único nucleotídeo até a modificação de um conjunto de cromossomos, e a maioria delas visa aumentar as possibilidades do organismo de adaptar-se ao ambiente e de sobreviver. Além disso, as mutações alteram macromoléculas que constituem o genoma, levando a uma variação genética chamada polimorfismo.

Os polimorfismos, juntamente com outras forças evolutivas como seleção, migração e deriva genética (mudança da frequência alélica de forma randômica em uma população), levam a uma diferenciação de indivíduos, espécies e grupos de ordem taxonômica maior. Os marcadores moleculares surgiram a partir dessas variações e se tornaram muito presentes ao longo do genoma, sendo por isso utilizados como ferramentas para detectar singularidades genéticas em indivíduos, espécies ou populações, além de identificar diversidade genética. Eles apresentam propriedades biológicas características que podem ser medidas ou detectadas em qualquer parte do corpo, como sangue ou tecidos, em qualquer estágio de desenvolvimento. Os marcadores moleculares podem ser identificados por meio de diversas técnicas de biologia molecular, incluindo a técnica de PCR e sondas.

1.1 CONCEITOS E DEFINIÇÕES

Nucleosídeos são glicosilaminas que fazem parte da estrutura das moléculas dos nucleotídeos, a unidade estrutural do DNA (ácido desoxirribonucleico) e do RNA (ácido ribonucleico). Tanto os nucleosídeos como os nucleotídeos são componentes vitais das células e estão envolvidos em vários processos biológicos.

Os nucleosídeos são compostos por uma base heterocíclica contendo nitrogênio e uma

ÁCIDOS NUCLEICOS, ANÁLOGOS DE NUCLEOTÍDEOS, MARCADORES E SONDAS MOLECULARES

pentose, ambas ligadas através de uma ligação glicosídica. A fosforilação dos nucleosídeos no primeiro grupo hidroxila da pentose dá origem aos nucleotídeos, que, através de ligações do tipo fosfodiéster, formam os ácidos nucleicos. Os nucleotídeos podem ser mono, di ou trifosfatados, e no DNA estão presentes nucleotídeos monofosfatados. A ribose é a pentose presente no RNA, enquanto a desoxirribose está presente no DNA. Ambas se diferenciam pelas moléculas presentes no carbono 2, sendo que na ribose há a presença de um grupamento hidroxila, enquanto na desoxirribose há um átomo de hidrogênio nessa mesma posição. As bases nitrogenadas que formam o DNA são: Adenina (A), Citosina (C), Guanina (G) e Timina (T). A e G são bases púricas (derivadas das purinas), e C e T são bases pirimidicas (derivadas das pirimidinas).

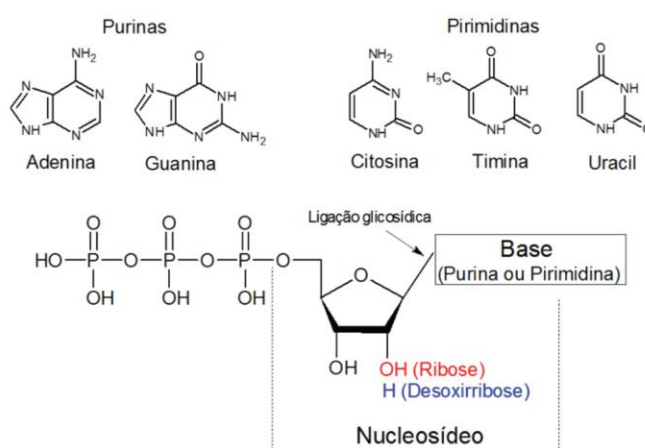


Figura 1. Estrutura dos nucleosídeos e nucleotídeos.

Duas longas cadeias de nucleotídeos se unem na forma de uma dupla fita ou dupla hélice, unida por pontes de hidrogênio entre as bases dos nucleotídeos. Cada base nitrogenada é pareada com sua base complementar na outra cadeia, dando origem assim a uma macromolécula. T pode parear com A por meio de duas pontes de hidrogênio, e C pode parear com G formando três pontes de hidrogênio. O RNA possui uma estrutura química semelhante a uma fita simples do DNA, no entanto, além de o açúcar presente ser a ribose, a base Uracil (U) substitui a Timina (T).

Nos organismos eucarióticos, o DNA está nos cromossomos, que consistem em moléculas de DNA organizadas e compactadas por meio de um complexo proteico denominado cromatina. A estrutura do DNA é similar para todos os organismos vivos. Todavia, a sequência dos nucleotídeos, o conjunto de cromossomos e a quantidade de informação genética nessas sequências são bastante variáveis, sendo esses os motivos para haver diferenciação de espécies e, inclusive, variações genotípicas dentro da mesma espécie. Muitas dessas alterações, denominadas polimorfismos e causadas por mutações, originaram marcadores moleculares ao longo da molécula de DNA.

Marcadores moleculares, também considerados marcadores genéticos, são variações

BIOTECNOLOGIA MARINHA

de fragmentos específicos de DNA usados para marcar ou rastrear um *locus* (localização específica) em um determinado cromossomo – por exemplo, um gene marcador. O gene marcador tem sua localização conhecida ou clara expressão fenotípica, podendo ser detectado por meio de métodos analíticos ou por uma sequência de DNA identificável, facilitando assim o estudo de herança genética.

Os genes marcadores ou locais específicos nos cromossomos são sítios de heteroziguidade, isto é, sítios onde ocorrem alterações na sequência de DNA entre membros de uma mesma população, podendo isso ser determinado pelas diferentes formas alélicas do gene ou pelo *locus* gênico. Entre as possíveis causas dessas variações estão incluídas as inserções, translocações, deleções, duplicações e pontos de mutação. Além disso, esses marcadores estão associados com a determinação de certas características que podem ser transmitidas de uma geração a outra.

Com o desenvolvimento da biologia molecular e biotecnologia nas últimas décadas, pesquisadores desenvolveram diversas técnicas moleculares capazes de detectar os marcadores moleculares presentes nos organismos. Em alguns casos, essas técnicas são também chamadas de marcadores moleculares, pois sua utilização é essencial para que um determinado polimorfismo seja identificado (ex.: RFLP, RAPD).

Outra estratégia bastante utilizada atualmente para detectar essas variações genéticas são as sondas moleculares. Sondas são trechos de fragmentos de DNA ou RNA que reconhecem e se ligam em sequências de DNA ou RNA complementar, isto é, são capazes de detectar e identificar uma sequência-alvo no genoma.

1.2 HISTÓRICO

A variação genética de populações começou a receber atenção de cientistas especialmente a partir do final do século XIX, pois se percebeu que as diferenças na sequência de DNA dos organismos permitiam a identificação de sua espécie, além de possibilitar a análise de sua relação evolutiva com outras espécies.

Desde a determinação do modelo da estrutura do DNA, estabelecido por Watson e Crick no início dos anos 1950, passou-se a estudar e compreender a função do DNA e também dos genes, que começaram a ser utilizados para determinar as variações genéticas.

Entre os anos 60 e 90, com o desenvolvimento das pesquisas e tecnologias, os marcadores genéticos tornaram-se cada vez mais populares, por serem capazes de detectar tais variações, sendo utilizados na identificação de uma sequência específica de DNA ao longo dos cromossomos. Tornaram-se importantes para análise genômica e permitiram relacionar traços hereditários com variação genética, além de determinar parentesco e distância genética entre espécies.

Essa diferenciação entre os organismos teve um impacto significativo na ecologia marinha, já que um grande número de seres marinhos tem ciclos de vida complexos, incluindo formas larvais. As larvas são capazes de habitar diferentes ambientes e de se comportarem de forma muito diferente das formas adultas, dificultando identificá-las e relacioná-las. A tecnologia envolvendo a obtenção das sequências de DNA espécie-específicas e o desenvolvimento de

ÁCIDOS NUCLEICOS, ANÁLOGOS DE NUCLEOTÍDEOS, MARCADORES E SONDAS MOLECULARES

ferramentas moleculares, incluindo identificação de marcadores moleculares, técnica de PCR e sondas, auxiliaram os estudos da ecologia e da diversidade marinha, possibilitando a classificação de espécies, por exemplo, de ovos e larvas, distinção de espécies de uma mesma família ou gênero, obtenção de informações genéticas e de alterações evolutivas. Ainda, permitiram o isolamento do DNA de micro-organismos marinhos de seu hábitat, sem a necessidade de cultivo em laboratório, para posterior identificação.

1.3 ANÁLOGOS NATURAIS DE NUCLEOSÍDEOS DE ORIGEM MARINHA COM ATIVIDADE BIOLÓGICA

A descoberta de nucleosídeos com bioatividade em diversas fontes marinhas estimulou atividades de pesquisa voltadas para o isolamento dessas moléculas, bem como a síntese de análogos e a avaliação das atividades biológicas desses compostos. Em especial, os esforços focaram na busca por novos análogos de nucleosídeos naturais com potencial atividade antibacteriana, antiviral, antiparasitária e antitumoral.

A prospecção de fármacos a partir de moléculas oriundas do ambiente marinho deu um importante passo na década de 50, quando o grupo do pesquisador Werner Bergmann, da Universidade de Yale (EUA), isolou dois nucleosídeos incomuns a partir da esponja marinha *Tectitethya crypta* (anteriormente denominada *Cryptotethya crypta*). Esses compostos, chamados de espongotimidina e espongouridina, eram nucleosídeos similares aos constituintes dos ácidos nucleicos (DNA e RNA), mas continham um resíduo de arabinose no lugar da ribose e desoxirribose presentes no RNA e DNA. Esses análogos naturais de nucleosídeos demonstraram inicialmente uma significativa atividade antiviral, e o estudo do mecanismo de ação como inibidores da transcriptase reversa inspirou a síntese de vários compostos que vieram a ser utilizados no tratamento de infecções virais e de câncer. Espongotimidina e espongouridina podem ser considerados precursores de compostos análogos a nucleosídeos que agem como antimetabólitos, e inspiraram a prospecção de moléculas que tiveram suas atividades avaliadas frente a diversas doenças humanas, entre elas vários tipos de câncer e infecção por HIV. Entre os produtos inspirados nesses análogos de nucleosídeos, que alcançaram êxito e foram disponibilizados comercialmente, estão o Ara-C (citosina-arabinosídeo), usado no tratamento de leucemias, o antiviral Ara-A (adenina-arabinosídeo) e o AZT (azidotimidina), um dos primeiros medicamentos usados no tratamento da AIDS e das infecções pelo vírus HIV. Ara-C, ou Citarabina, é usado principalmente no tratamento da leucemia aguda não linfoblástica, enquanto Ara-A, ou Vidarabina, é usado na forma de colírio no tratamento de infecções oftalmológicas pelo vírus *Herpes simplex*.

A descoberta desses nucleosídeos naturais bioativos contendo um açúcar diferente da ribose ou desoxirribose inspirou uma geração de novos compostos com potencial terapêutico, sendo essa característica fundamental no mecanismo de ação dessas moléculas, já que a incorporação destas ao DNA durante a replicação resulta no bloqueio do processo de síntese. Embora a síntese de nucleosídeos seja conhecida desde o final da década de 40, o isolamento desses compostos e a busca por seus análogos sintéticos permanecem sendo de interesse por causa de seus perfis farmacológicos promissores.

2 | MARCADORES E SONDAS MOLECULARES: ABORDAGENS METODOLÓGICAS

Os marcadores moleculares, utilizados para identificar diferenças em nível molecular entre indivíduos e populações, podem ser classificados em três grupos: proteínas variantes, polimorfismo na sequência de DNA e variação na repetição do DNA. Entre os mais importantes marcadores e as técnicas utilizadas para sua detecção, encontram-se as alozimas, polimorfismo no comprimento do fragmento de restrição (RFLP – *restriction fragment length polymorphism*), polimorfismo do DNA amplificado ao acaso (RAPD – *randomly amplified polymorphic DNA*), polimorfismo de comprimento de fragmentos amplificados (AFLP – *amplified fragment length polymorphism*), polimorfismo de nucleotídeo único (SNP – *single nucleotide polymorphism*), entre outros. Para o ambiente marinho, as vantagens dessas técnicas incluem: aumentar o conhecimento sobre relações filogenéticas, diferenciar estágios de vida iniciais de espécies morfologicamente próximas e variação genética de organismos dentro de uma população. A seguir serão descritos os principais marcadores moleculares utilizados nas áreas biológicas.

2.1 ALOZIMAS

Alozimas foram os primeiros marcadores moleculares utilizados, já nos anos 60. Sua nomenclatura foi originada da junção das palavras ‘*allelic variants of enzymes*’, traduzido como ‘variantes alélicas de enzimas’. Esses marcadores são definidos como formas variantes de uma enzima devido a diferenças alélicas, com estruturas moleculares diferentes, porém com função catalítica similar. A forma alélica alternativa de uma enzima ocorre como consequência de substituições de aminoácidos ao longo da cadeia polipeptídica, o que resulta em uma alteração da composição da proteína. Essas mudanças podem resultar em diferentes produtos proteicos que irão migrar de forma alternativa (em diferentes tempos e velocidades), de acordo com seus diferentes tamanhos e cargas, visualizados na forma de bandas (alelos) em um gel de eletroforese.

A metodologia geral utilizada para detectar a variação de alozimas inclui as etapas de extração, eletroforese e detecção. As frações proteicas, extraídas através da utilização de solventes, são adicionadas a um gel sólido (ex.: acrilamida) e colocadas em um sistema de eletroforese, que é uma técnica de separação baseada no deslocamento de moléculas carregadas em um campo elétrico. Pelo fato de a maioria das proteínas possuírem carga negativa, elas migram do ponto inicial cátodo (negativo) para o final ânodo (positivo). Assim, se a amostra de um indivíduo homocigoto para uma proteína for analisado, será observado apenas uma banda no gel, enquanto a de um indivíduo heterocigoto apresentará duas bandas.

A detecção de alozimas é considerada um método sensível, sendo efetivo mesmo com a utilização de baixas quantidades de material, que pode variar desde amostras de culturas bacterianas até fluidos animais. Além disso, a simplicidade, rapidez, baixo custo e necessidade de equipamentos simples para sua realização tornaram essa técnica amplamente utilizada para detecção de variações moleculares. O protocolo técnico dessa metodologia, após padroniza

ÁCIDOS NUCLEICOS, ANÁLOGOS DE NUCLEOTÍDEOS, MARCADORES E SONDAS MOLECULARES

ção, é facilmente ajustável para os diferentes tipos de amostras e espécies, e de fácil interpretação.

Por essas vantagens, as alozimas tiveram um impacto significativo nos estudos sobre a fauna marinha, pois foram amplamente utilizadas para diferenciar espécies de diversos organismos, especialmente de peixes. Elas são atualmente utilizadas na identificação de estrutura populacional, conservação genética, hibridização, herança de genes e mapeamento genético. Um exemplo dessa aplicabilidade foi o atum-azul (*Thunnus spp.*), que tem duas espécies morfológicamente muito similares que costumavam ser confundidas, o que aumentava o risco de extinção de uma delas. Isso foi resolvido por meio de análises espécie-espécie por alozimas e DNA mitocondrial (conforme explicado a seguir). O mesmo aconteceu para os peixes *Argyrosomus spp.*, *Zacco spp.*, *Mullus spp.*, *Merluccius spp.* e para o crustáceo *Pseudocalanus spp.* Além disso, a técnica é capaz de identificar organismos híbridos de origem natural ou artificial originados do cruzamento genético de duas espécies diferentes, como observado para híbridos de *Haliotis laevigata* e *H. rubra*. Também já foram detectados polimorfismos na enzima lisossomal leucina aminopeptidase no molusco *Ruditapes philippinarum*, provavelmente devido a uma adaptação à variação ambiental.

Entretanto, essa metodologia apresenta algumas desvantagens, como a não detecção de mutações nulas, isto é, alteração de nucleotídeo na sequência de DNA que não alteram a proteína codificada ou mudanças na cadeia polipeptídica que não alteram a migração em um gel eletroforético. Além disso, ela detecta apenas genes bastante expressos, e possui baixo número de marcadores, o que levou à diminuição do número de pesquisas utilizando esse marcador ao passar dos anos.

2.2 DNA MITOCONDRIAL (mtDNA)

Uma pequena percentagem (<1%) do DNA de células eucarióticas encontra-se fora do núcleo celular, sendo esse o DNA mitocondrial (mtDNA). O mtDNA é um genoma extra-cromossomal presente no interior das mitocôndrias e que tem como característica ser herdado apenas da linhagem materna, não havendo contribuição paterna.

Os marcadores de DNA mitocondrial são considerados uma classe separada da classe de DNA nuclear devido a suas diferentes dinâmicas evolutivas: o DNA mitocondrial tem uma taxa evolutiva muito maior comparado com o genoma nuclear. Estudos em algumas espécies de vertebrados mostraram que diferentes sequências se acumulam mais rapidamente no DNA mitocondrial do que no nuclear, provavelmente devido às altas taxas de mutação resultantes da falta de mecanismo de reparação durante a replicação e do menor tamanho populacional efetivo devido à estreita herança materna do genoma mitocondrial haploide. Além disso, regiões não codificantes do DNA mitocondrial, como a região "D-loop", onde é iniciada tanto a replicação quanto a transcrição de moléculas, apresentam níveis elevados de variação na sequência codificante, como no gene citocromo b. Isso ocorre provavelmente devido à pressão seletiva relaxada.

Devido à sua alta taxa evolutiva, as análises por meio de mtDNA são utilizadas para construção de filogenias e verificação das interferências evolutivas, muito úteis para comparação

BIOTECNOLOGIA MARINHA

intra e interespecies. Ajudaram a relacionar espécies evolutivamente próximas e a investigar a estrutura da variação entre os vertebrados, incluindo peixes, pássaros, répteis e mamíferos. Em organismos marinhos, foi possível identificar ovos e larvas de peixe-agulha que eram morfológicamente muito similares. Em um estudo de Hyde e colegas (2005), foram identificadas sete larvas de peixes coletadas da costa Kona, no Havá. Verificou-se que cada uma dessas larvas tinha uma sequência única de mtDNA, indicando que tinham “mães” diferentes, e que o local era uma região de reprodução das espécies. A análise de variação de mtDNA também já foi utilizada para revelar diferenciação populacional, como em esperma de baleias ao longo de bacias oceânicas. Além disso, mtDNA possibilita verificar perda ou não de diversidade genética de ancestrais comparados com seus descendentes.

A detecção de variações em mtDNA é amplamente realizada por meio da técnica de RFLP, descrita abaixo. A análise pode ser feita por RFLP utilizando todo mtDNA purificado de um tecido digerido por enzimas endonucleases ou pode ter fragmentos de seu DNA sequenciados após amplificação por PCR (descrito posteriormente).

2.3 RESTRICTION FRAGMENT LENGTH POLYMORPHISM (RFLP)

Os RFLPs foram descobertos nos anos 70 e foram um dos pioneiros no conceito de análise de variações no DNA como marcadores genéticos, sendo utilizados na área de ciência forense e outras. Eles são referenciados tanto como técnica quanto como marcador, pelo fato de a técnica molecular utilizada para gerar os RFLPs ser necessária para a visualização dos polimorfismos nas regiões de interesse. Assim, o RFLP é uma técnica que utiliza a ação de uma endonuclease para gerar fragmentos de restrição de DNA com tamanhos variados, de acordo com cada polimorfismo existente. Isto é, essa metodologia foi desenvolvida para visualizar as diferenças na estrutura do DNA de indivíduos por meio do uso de enzimas de restrição bacterianas, que cortam o DNA em locais onde há a presença de uma sequência de nucleotídeos específica. Em outras palavras, quando o DNA de diferentes indivíduos (com diferentes polimorfismos) é digerido por enzimas de restrição, pode-se averiguar diferentes tamanhos dos fragmentos de DNA (os RFLPs). Essas diferenças se dão por mudanças evolutivas nas sequências de nucleotídeos entre os indivíduos, que podem ser resultado de mutações pontuais, deleções, inserções, inversões ou translocações nos cromossomos. A identificação das variações por essa metodologia requer a utilização de gel de eletroforese para separar os fragmentos de DNA de diferentes tamanhos, seguida pela transferência dos fragmentos para uma membrana de nylon (Southern blot) e visualização de uma sequência específica de DNA por meio de sondas radioativas ou quimioluminescentes expostas a um filme de raio-X.

Os primeiros dados gerados utilizando o RFLP foram realizados em vírus e com o gene da globina humana. A partir disso, essa técnica começou a ser amplamente utilizada na área biotecnológica, sendo que o primeiro mapa genético do DNA e o primeiro estudo de associação genética foram realizados com base nesses marcadores moleculares. Além disso, análises por RFLP do DNA mitocondrial (mtDNA) e DNA ribossomoal (rDNA) foram aplicadas tanto na genética populacional quanto na sobrevivência biogeográfica e filogenética. No caso de identificação de organismos marinhos, essa técnica já foi utilizada para diferenciar diversas espécies de lar

ÁCIDOS NUCLEICOS, ANÁLOGOS DE NUCLEOTÍDEOS, MARCADORES E SONDAS MOLECULARES

vas de lagostas (*Panulirus argus*, *P. guttatus* e *P. laevicauda*) e moluscos (*Mytilus trossulus* e *M. galloprovincialis*). É bastante comum identificar marcadores RFLP em regiões bem conservadas evolutivamente, como nos genes 16s rRNA, 18s rRNA e 28s rRNA, explicados de forma mais detalhada no decorrer deste capítulo.

Algumas desvantagens dessa metodologia, que atualmente já não é muito utilizada, incluem a grande demanda de tempo para realizá-la e também a necessidade de uma grande quantidade de amostra, em comparação com outras técnicas mais modernas.

2.4 MINISSATÉLITES

Os minissatélites são definidos como unidades de repetições em *tandem*, ou seja, são sequências específicas de DNA que se repetem uma atrás da outra (ex.: AAACCTAACCTAACCT). Essas sequências repetidas são denominadas de *core*. Assim, cada uma dessas unidades contém um *core* de 12-16 nucleotídeos e duas sequências flanqueadoras do mesmo. É comum, ao longo do genoma, haver loci com o mesmo *core*, mas regiões flanqueadoras distintas. Por isso, quando há uma hibridização de uma sonda com a sequência *core*, o resultado é um perfil multibanda, único para cada indivíduo. De forma similar ao que é realizado no RFLP, as análises de minissatélites iniciam-se com a digestão do DNA genômico com enzimas de restrição para verificar mudanças no número de repetições em *tandem*.

As taxas extremamente altas de polimorfismo nos minissatélites geraram uma grande revolução na identificação genética dos indivíduos, originando uma técnica chamada de *fingerprinting* (análise de sequências repetitivas em diversos loci do DNA capaz de diferenciar indivíduos). Os minissatélites são considerados ideais para identificação individual, e têm sido utilizados para deduzir relação genética entre indivíduos aleatórios de uma mesma população. Além disso, já foram aplicados na detecção de variação genética em populações de peixes, diferenças populacionais de acordo com localização geográfica e estimação de sucesso do acasalamento.

2.5 IDENTIFICAÇÃO DE MARCADORES COM BASE NA TÉCNICA DE PCR

A principal descoberta na área dos marcadores moleculares, que permitiu sua aplicação em estudos em nível molecular para diversas áreas, incluindo ecologia marinha, foi a reação em cadeia da polimerase (PCR, *polymerase chain reaction*). A PCR foi desenvolvida por Kary Mullis nos anos 1980. Essa técnica possibilitou a amplificação de fragmentos específicos de DNA de um genoma complexo e de amostras de tecidos pequenos e mal preservados, sendo por isso classificada como uma metodologia sensível (necessidade de baixas concentrações de amostra). Os produtos da amplificação da PCR do DNA de diferentes indivíduos são analisados pela determinação tanto do tamanho quanto de sua sequência.

A PCR consiste na geração de milhões de cópias de um segmento específico de DNA. Esse processo necessita da ação da enzima DNA polimerase, responsável por sintetizar uma fita de DNA complementar utilizando como modelo a fita de DNA original. Essa enzima, entretanto, só pode adicionar um novo nucleotídeo em um grupo 3'-OH livre, e para isso são necessá-

BIOTECNOLOGIA MARINHA

rios *primers*, também chamados iniciadores moleculares (sequências curtas de nucleotídeos), para que o primeiro nucleotídeo seja adicionado e inicie, assim, as reações em sequência. Isso possibilita delinear uma região de sequência específica que se deseja amplificar.

Explicando a metodologia de forma mais detalhada: para a realização da reação de PCR são necessários diversos componentes químicos: (i) uma pequena quantidade de DNA que serve como modelo inicial ou sequência-alvo; (ii) um par de *primers* desenhados para ligar um em cada extremidade da sequência-alvo; (iii) DNA polimerase; (iv) quatro dNTPs, nucleotídeos sintéticos para Adenina (A), Citosina (C), Guanina (G) e Tirosina (T); (v) volume de íons e sais.

A PCR mimetiza o processo natural de replicação do DNA que ocorre nas células. Para isso, realiza diversos ciclos de aumento e diminuição de temperatura. Cada um desses ciclos é dividido em três etapas: desnaturação, anelamento e extensão.

- **Desnaturação:** inicialmente, o DNA da amostra é desnaturado pelo aumento de temperatura que varia entre 90 °C e 100 °C, havendo assim a separação da dupla-fita de DNA pela quebra das pontes de hidrogênio que as conectam.
- **Anelamento:** em seguida, a temperatura inicial de interesse é alcançada (entre 30 e 65 °C) e mantida por alguns minutos. Isso permite que os *primers* se liguem na sua sequência complementar no DNA de fita simples.
- **Extensão:** durante a fase final, a amostra sofre novamente um aquecimento (entre 60 e 75 °C), temperatura ideal para o funcionamento da enzima DNA polimerase. Essa enzima então se liga aos *primers* e inicia a extensão da fita complementar utilizando como modelo a fita simples de DNA original. Isso ocorre pela adição dos dNTPs correspondentes à sequência da fita de DNA, gerando uma cópia idêntica da sequência de interesse. Esse processo resulta em uma duplicação do DNA original, no qual cada molécula nova contém uma fita nova e uma fita antiga de DNA. O ciclo é repetido de 30 a 40 vezes, gerando bilhões de cópias idênticas desse segmento específico de DNA.

A PCR é utilizada para identificar diversos marcadores moleculares, sendo os mais populares (eficientes para a análise da estrutura populacional intraespecífica) os loci de microsatélite e sequência de repetições únicas (SNP).

2.5.1 MICROSSATÉLITES

Os microsatélites foram os primeiros a serem amplificados pela técnica de PCR. Da mesma forma que os minissatélites, os microsatélites são sequências com repetições simples em *tandem*, que variam de um a seis pares de base (ex.: ACA, GATA) e se repetem em média de cinco a vinte vezes. São abundantes no genoma nuclear de todas as espécies e estima-se uma frequência de um em cada 10 kilobases (kb) em peixes, isto é, há presente, em média, um microsatélite a cada mil pares bases. Na literatura, os microsatélites já foram referenciados com outras nomenclaturas como número variável de repetições em *tandem* (VNTRs, *variable*

ÁCIDOS NUCLEICOS, ANÁLOGOS DE NUCLEOTÍDEOS, MARCADORES E SONDAS MOLECULARES

number of tandem repeats), como polimorfismos de comprimento de sequência única (SLPs, *simple sequence length polymorphisms*) e repetições de sequência simples (SSP, *simple sequence repeats*).

Por seu tamanho reduzido, os loci de microssatélites podem ser amplificados por PCR, e suas sequências são utilizadas como base para o desenho dos *primers*. Essas regiões (loci) são altamente polimórficas, muito frequentes e distribuídas ao longo do genoma e em todos os cromossomos, mas especialmente na eucromatina (local do DNA na cromatina onde os genes encontram-se ativos e ocorre a síntese de RNA), o que permite sua utilização em mapeamento genético e genética populacional.

A utilização de microssatélites apresenta a vantagem de necessitar de pequenas quantidades de DNA (por ter como base a técnica de PCR), além de serem bons marcadores para análise de parentesco, filogenia e para estimar o grau de proximidade entre indivíduos de uma população. Já as desvantagens incluem o alto preço e tempo de execução. Na ecologia marinha, são utilizados para identificar espécies de peixes, migração e predominância de população em um determinado hábitat (ex.: salmões, golfinhos, trutas).

2.5.2 SINGLE NUCLEOTIDE POLYMORPHISMS (SNP)

O SNP faz parte da terceira geração de marcadores moleculares. Foi primeiramente descrito por Lander, em 1996. É utilizado para investigar variação genética entre diferentes espécies de animais. Os SNPs são descritos como polimorfismos causados por mutações pontuais, em um único nucleotídeo no genoma, isto é, quando um único nucleotídeo (A, T, C ou G) em uma determinada sequência é substituído, inserido ou deletado. Isso resulta em diferentes alelos que contêm bases nucleotídicas diferentes em uma determinada posição dentro de um *locus*. Eles representam o polimorfismo mais abundante em todos os organismos vivos, tanto em regiões codificantes quanto em não-codificantes. As causas para que ocorram esses polimorfismos incluem transições de base única, transversões, inserções e deleções, sendo a mais comum a transição (troca de uma purina por outra ou de uma pirimidina por outra).

Os SNPs têm algumas propriedades que os tornaram populares no mundo científico: são abundantes no genoma, são geneticamente estáveis, seus marcadores são capazes de detectar doenças multifatoriais em seres humanos e de identificar polimorfismos “escondidos”, que não eram detectados por meio de outros marcadores e métodos. Todavia, fazem-se necessários ensaios automatizados para a detecção de SNPs, podendo ser utilizados métodos baseados no uso de gel ou não. No caso da utilização de gel, *primers* específicos são desenhados para amplificar alelos positivos (ocorre hibridização entre *primer* e amostra). Já nos métodos que não utilizam géis, as regiões de interesse são amplificadas e detectadas por técnicas como cromatografia, espectrometria de massas, microarranjo ou por fluorescência.

A descoberta desses marcadores foi importante tanto para o mundo animal quanto para os seres humanos, pois possibilitou analisar estrutura populacional, diferenciação genética, origem e pesquisa sobre evolução. Além disso, possibilitou o diagnóstico de doenças por meio marcadores específicos, inclusive em animais marinhos como peixes.

BIOTECNOLOGIA MARINHA

2.5.3 DNA BARCODING

Um *DNA barcode* refere-se a uma sequência curta de DNA em uma região bem estabelecida do genoma, utilizada para identificar espécies. O objetivo desse marcador é averiguar em larga escala um ou mais genes de referência para classificar indivíduos desconhecidos dentro de uma espécie ou para descobrir novas espécies.

Tautz e Paul Hebert foram os dois pesquisadores que sugeriram o uso do gene mitocondrial citocromo oxidase I (COI), um gene mtDNA, como uma sequência comum entre os animais para o estudo de *DNA barcoding*. Dessa forma, o barcode é identificado por meio de *primers* de PCR para amplificar e sequenciar fragmentos de aproximadamente 600 pares de base (pb) do gene COI, que posteriormente são comparados com um banco de dados de sequências conhecidas de espécies previamente identificadas. Essa técnica possibilita identificar espécies relacionadas e também sua frequência em diversos filos.

O *DNA barcoding* tem acurácia de quase 98% e fornece uma estratégia de identificação rápida para diversidade genética de animais, incluindo organismos desconhecidos. Como exemplo, podemos citar o estudo de Raupach et al. (2015) que montou uma biblioteca com mais de 1330 sequências de *DNA barcode*, cobrindo 205 espécies de crustáceos marinhos coletados no mar do hemisfério norte até 2015. Eles provaram que essa metodologia é efetiva para identificação e análise de crustáceos, além de ser uma etapa importante para estudos modernos de biodiversidade. As desvantagens dessa técnica incluem a dificuldade de obter fragmentos do genoma e a impossibilidade de identificação de alguns organismos pelo gene COI devido às baixas taxas de evolução da sequência de COI em algumas espécies.

2.5.4 RANDOM AMPLIFIED POLYMORPHIC DNA (RAPD)

A técnica de RAPD baseia-se em amplificações randômicas de *locus* desconhecido por meio da reação de PCR. Os RAPDs, assim como os RFLPs, são também considerados tanto técnica quanto marcador, pois a tecnologia molecular utilizada para gerar os RAPDs é necessária para que haja a identificação dos polimorfismos de interesse, os randômicos nesse caso. Essa tecnologia possibilita uma rápida e eficiente varredura no genoma por sequências de DNA polimórficas em um grande número de *loci*. A principal vantagem é não ser necessário conhecimento prévio sobre as sequências do DNA de interesse ou da organização do genoma. Além disso, permite que um grande número de *loci* e indivíduos possam ser analisados simultaneamente. É uma técnica simples, rápida e barata e necessita de pequena quantidade de amostra para a hibridização molecular dos *primers*.

O princípio do RAPD baseia-se no uso de *primers* de oligonucleotídeos (sequências curtas), capazes de se ligar em diferentes *loci* e em múltiplos locais no genoma, para amplificar sequências aleatórias de um DNA complexo (os RAPDs). Isso permite detectar altos níveis de polimorfismo no DNA. Além disso, a estratégia é capaz de detectar tanto sequências de DNA codificantes quanto não-codificantes, e os segmentos polimórficos que mais trazem informações relevantes são os derivados de sequências repetitivas (não-codificantes).

Entre suas aplicações, constatou-se sua habilidade de identificar *fingerprints* especi-

ÁCIDOS NUCLEICOS, ANÁLOGOS DE NUCLEOTÍDEOS, MARCADORES E SONDAS MOLECULARES

ficos de espécies em diversos peixes, possibilitando, assim a determinação de suas relações taxonômicas. Entre os exemplos de diferenciação de espécies ou relação genética, através de marcadores RAPDs, estão os peixes do gênero *Barbus*, da família dos ciprinídeos (como carpas), lambari tambuí (*Astyanax altiparanae*), *Mullus surmuletus*, *Salmo trutta* e dourado (*Sparus aurata*).

As desvantagens dos marcadores RAPD são: detecção dos polimorfismos somente na presença ou ausência de uma banda com peso molecular determinado, não havendo informações sobre heteroziguidade; difícil reprodutibilidade e dificuldade de análise devido ao grande número de produtos gerados.

2.5.5 AMPLIFIED FRAGMENT LENGTH POLYMORPHISMS (AFLP)

Os marcadores AFLPs (também considerado uma técnica) são os mais abrangentes em suas aplicações nas análises de variação genética em nível de espécie, principalmente na investigação estrutural de população e suas diferenças. É uma técnica de *fingerprinting* que permite uma rápida análise do genoma inteiro sem conhecimento prévio de suas sequências. A metodologia baseia-se na amplificação de fragmentos de restrição por PCR, gerados a partir de um DNA genômico digerido por endonucleases. Os polimorfismos moleculares são identificados com base na presença ou ausência de sequências curtas de DNA reconhecidas por essas enzimas de restrição em diversos locais dentro do genoma. A variação da presença ou ausência desses segmentos promove um padrão de bandas diferentes em um gel de eletroforese, resultantes dos diversos produtos de PCR (varia de acordo com o indivíduo).

Estudos com AFLP não necessitam de *primers* espécie-específicos e são realizados em quatro etapas: (i) digestão do DNA genômico por duas enzimas de restrição; (ii) ligação de adaptadores de oligonucleotídeo dupla-fita nas extremidades de cada fragmento de DNA gerado; (iii) amplificação dos fragmentos por PCR através da utilização de *primers* complementares à sequência dos adaptadores; (iv) análise em gel desnaturante de poliacrilamida dos padrões gerados pelos segmentos de DNA amplificados (Figura 2).

As vantagens dessa técnica incluem o baixo custo e tempo, alta reprodutibilidade, alta resolução comparada com outros marcadores como RAPD, RFLP e microssatélites, e alta sensibilidade, provavelmente devido à presença de um grande número de marcadores. Sua aplicabilidade está incluída na genética de população, mapeamento quantitativo de traços de *locus* e detecção de polimorfismos. Uma vez que essa metodologia produz um *fringerprint* genético, pode ser utilizada para verificar a conexão entre populações. Entretanto, AFLPs são marcadores bialélicos dominantes, não sendo possível distinguir indivíduos homocigotos ou heterocigotos dominantes.

AFLP tem sido utilizada também em estudos de genética ecológica. Por exemplo, Shank e Halanych (2007) identificaram variações genéticas dentro da espécie do verme de águas profundas *Riftia pachyptila*. O estudo de Gruenthal (2007) verificou essas variações em *Haliotis rufescens* (concha abalone vermelho) e Hoffman (2012) analisou polimorfismos em animais marinhos da Antártica, desde corais até peixes de mar aberto. Além disso, AFLPs podem realizar um "scan genômico" que permite analisar associações entre marcadores específicos e hábitat.

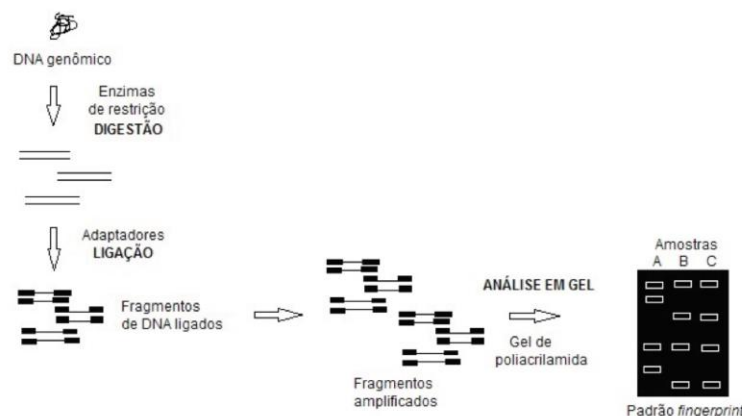
BIOTECNOLOGIA MARINHA


Figura 2. Esquema das quatro etapas básicas para identificação por AFLP.

2.6 MÉTODOS ALTERNATIVOS PARA IDENTIFICAR MARCADORES MOLECULARES

2.6.1 SEQUENCIAMENTO

Outro método capaz de identificar a sequência genômica dos seres vivos é o sequenciamento. O sequenciamento do DNA é a determinação da ordem sequencial dos nucleotídeos de um gene. Essa tecnologia começou a ser utilizada nos anos 1975, com o desenvolvimento do sequenciamento de Sanger, metodologia que mimetiza o processo de replicação do DNA e foi estabelecida por Sanger, um cientista ganhador do Prêmio Nobel por suas contribuições sobre sequenciamento de bases nos ácidos nucleicos.

O sequenciamento de Sanger é capaz de definir a ordem das bases nitrogenadas por meio de dideoxínucleotídeos trifosfatos (ddNTPs), isto é, nucleotídeos modificados que impedem a continuação do crescimento da fita de DNA durante a replicação. Eles são chamados de moléculas terminadoras, pois não apresentam o grupamento 3' hidroxila (OH) disponível, necessário para formar a ligação fosfodiéster entre dois nucleotídeos, causando, assim o fim do alongamento da fita. Essas terminações geram um grande número de fragmentos de DNA com diferentes comprimentos. Tais fragmentos são então separados por tamanho através de sua aplicação em um gel de eletroforese e cada tamanho de banda no gel representa um dos nucleotídeos (A, T, G ou C), indicando assim sua posição na sequência do DNA.

Portanto, cada reação para o sequenciamento é composta por um DNA amostral, *primers* específicos para iniciar a replicação (nos quais a enzima DNA polimerase se liga), quatro dideoxínucleotídeos (dATP, dGTP, dCTP e dTTP) e DNA polimerase. Após o início do processo, os dideoxínucleotídeos são adicionados à fita complementar de acordo com a ordem nucleotídica da fita molde do DNA amostra.

Ao longo do tempo, o sequenciamento foi sendo aprimorado e automatizado. Uma dessas novas estratégias foi responsável por adicionar fluoróforos aos ddNTP, permitindo que as reações fossem lidas por coloração. Ou seja, cada dideoxínucleotídeo é marcado com uma cor

ÁCIDOS NUCLEICOS, ANÁLOGOS DE NUCLEOTÍDEOS, MARCADORES E SONDAS MOLECULARES

diferente, permitindo que seja identificada a ordem dos nucleotídeos em um equipamento específico que identifica as diferentes cores. A partir dos anos 90, surgiram novas técnicas de sequenciamento que ficaram conhecidas como “sequenciamento de nova geração”, que envolvem a adição de outras moléculas identificadoras para cada ddNTP.

Da mesma forma que o sequenciamento foi utilizado em diversas áreas de estudo, ele foi extremamente útil para a investigação dos genomas de organismos marinhos. Isso permitiu que estudos sobre evolução genômica e conservação fossem avaliados; permitiu a identificação de organismos com pequenas quantidades de amostra, já que a extração de DNA de qualidade suficiente é difícil para organismos marinhos devido às suas altas concentrações de polissacarídeos, fenóis e metabólitos secundários. Também, por ser uma metodologia bastante sensível, o sequenciamento possibilitou o reconhecimento genômico de espécies por meio da extração de DNA de apenas um indivíduo, já que espécies marinhas apresentam grandes populações com genomas altamente variáveis, especialmente invertebrados e algas.

2.6.2 REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE DE TRANSCRIÇÃO REVERSA EM TEMPO REAL (RT-qPCR)

A Reação em Cadeia da Polimerase de Transcrição Reversa em Tempo Real (RT-qPCR) é uma técnica com princípio similar ao da PCR tradicional, porém com algumas diferenças, incluindo: (i) na RT-qPCR, os dados são coletados a cada ciclo através da emissão de fluorescência que ocorre em decorrência da incorporação de marcadores de fluorescência no produto de PCR durante a amplificação; ou seja, a quantidade de produto amplificado é proporcional à fluorescência gerada em cada ciclo, e isso é captado por um equipamento específico. Na PCR convencional, os dados são analisados apenas no final do processo e são visualizados em gel; (ii) a RT-qPCR é utilizada para quantificar RNA mensageiro (mRNA), ou seja, RNA codificado durante o processo de transcrição (precursores das sequências que serão traduzidas em proteínas). Para fazer a quantificação do mRNA, faz-se necessário realizar a síntese de cDNA, um DNA complementar que utiliza como molde a sequência de RNA que foi extraída da amostra a ser analisada. Já a PCR tradicional quantifica diretamente o DNA da amostra.

As vantagens da RT-qPCR (dita quantitativa) em comparação com a PCR convencional (dita semiquantitativa) incluem maior rapidez, reprodutibilidade e habilidade quantitativa, além de ser mais sensível. O tempo real possibilita quantificar facilmente a expressão de um determinado gene e fazer a distinção entre espécies relativas próximas evolutivamente, devido a sua capacidade de diferenciar pares de base. Na PCR muitas vezes não é possível observar diferenças significativas de expressão.

Assim, a RT-qPCR pode ser utilizada como uma alternativa da PCR padrão para detectar os marcadores moleculares, citados anteriormente, que têm como base essa técnica.

2.7 GENES MARCADORES PARA IDENTIFICAÇÃO DE ESPÉCIES

2.7.1 GENE 16S rRNA

BIOTECNOLOGIA MARINHA

A amplificação da sequência do gene 16S rRNA é comumente realizada, pois ele codifica para subunidade menor ribossomal de organismos procariotos. Isso é feito por meio de PCR, utilizando-se *primers* específicos para as regiões conservadas do 16S rDNA, a fim de identificar e diferenciar os seres procarióticos, mais especificamente as bactérias. Devido ao seu alto grau de conservação com a presença de regiões de sequências variadas, o 16S rDNA é usado como um marcador filogenético. A sequência do 16S rDNA permite a identificação e afiliação taxonômica de diferentes seres vivos, incluindo linhagens microbianas presentes em amostras do meio ambiente. Além disso, essa técnica permite a identificação de organismos desconhecidos e fornece informações sobre a biodiversidade nos ambientes, inclusive o marinho. Apesar de suas vantagens, tem como limitação o fato de prover informações restritas à distribuição e fisiologia do organismo no ambiente natural.

2.7.2 GENE 18S rRNA

Assim como o gene 16S rRNA, a amplificação do gene 18S rRNA se dá por meio de *primers* específicos. Esse gene é um RNA ribossomal, componente nuclear da subunidade menor, presente em eucariotos. A identificação desse gene é popularmente utilizado em pesquisas sobre diversidade e já foi utilizado para identificar micróbios eucarióticos de ambiente marinho e para diferenciar organismos.

2.7.3 GENE 28S rRNA

Gene nuclear codificante para RNA da subunidade maior ribossomal de eucariotos. O gene 28S rRNA é utilizado para estudos de filogenética e *DNA barcoding*. Já foi utilizado para identificação da composição de espécies e distribuição de organismos, como exemplo, presença do DNA de crustáceos em sedimentos de lagos da Antártica.

Quadro comparativo

Existem diversas técnicas de biologia molecular que podem ser utilizadas para o estudo de organismos marinhos. As mais utilizadas estão descritas de forma resumida na Tabela 1.

Tabela 1. Comparação de técnicas mais utilizadas para identificação de marcadores moleculares.

TECNOLOGIA	BASE EM PCR	FACILIDADE DE USO	QUALIDADE DO DNA	POSSÍVEL AUTOMATIZAÇÃO	REPRODUTIBILIDADE
Alozima	Não	Sim	Alta	Baixa	Baixa
RFLP	Não	Não	Alta	Baixa	Alta
RAPD	Sim	Sim	Alta	Moderado	Baixa
AFLP	Sim	Sim	Moderada	Moderado	Alta
Microssatélite	Sim	Sim	Moderada	Alto	Alta

ÁCIDOS NUCLEICOS, ANÁLOGOS DE NUCLEOTÍDEOS, MARCADORES E SONDAS MOLECULARES

TECNOLOGIA	BASE EM PCR	FACILIDADE DE USO	QUALIDADE DO DNA	POSSÍVEL AUTOMATIZAÇÃO	REPRODUTIBILIDADE
SNP	Sim	Sim	Alta	Alto	Alta
DNA <i>Barcoding</i>	Sim	Sim	Alta	Alto	Alta

2.8 DESENVOLVIMENTO DE OUTRAS TECNOLOGIAS

A descoberta da PCR foi um marco histórico na análise de genoma e trouxe uma nova classe metodológica capaz de detectar marcadores de DNA: as sondas. Para estudos básicos em laboratórios de biologia molecular, as sondas normalmente são usadas para identificação e isolamento de genes ou sequências relativas. Em teoria, qualquer ácido nucleico pode ser utilizado como uma sonda, desde que seja possível identificar e quantificar moléculas híbridizadas formadas pela junção da sonda com a sequência específica a ser detectada.

Após a hibridização, as sondas devem transmitir um sinal para que seja feita a detecção da sequência homóloga. Para isso, costuma-se adicionar à sonda um sinalizador, que pode ser um isótopo radioativo ou moléculas-sinais não-radioativas, como anticorpos fluorescentes, enzimas que realizam a troca de cor do meio ou compostos quimioluminescentes, que não interfiram na hibridização da sonda.

- **Sondas com marcação radioativa:** é considerado o método mais sensível de detecção. Há diversos tipos de isótopos disponíveis e eficientes quanto ao tempo de exposição necessário para permitir sua detecção, além de ter um bom sinal. Entre eles estão ^{32}P e ^{35}S que apresentam rápida detecção.
- **Sondas com marcação não-radioativa:** técnicas que utilizam marcações alternativas aos radioisótopos têm se tornado populares. Um exemplo disso é a utilização da biotina que tem afinidade com certos tipos de glicoproteína. Além disso, surgem alternativas, como a hibridização de ligantes aderidos à sonda com proteínas específicas que podem ser marcadas com moléculas enzimáticas ou fluorescentes. Isso permite que várias sondas sejam monitoradas simultaneamente, desde que cada ligante emita sinais diferentes.

As sondas quimioluminescentes também são eficientes. Seu sistema é baseado no uso de duas diferentes sondas que são complementares a um segmento de DNA e se ligam nas extremidades opostas de um determinado gene. O primeiro marcador é um quimioluminescente complexo que emite um determinado comprimento de onda, capaz de excitar a molécula presente na outra sonda, e esta, por sua vez, é capaz de emitir luz em um comprimento de onda diferente, que pode ser detectado por um equipamento fotomultiplicador. Contudo, para que o sistema seja efetivo, as duas sondas devem hibridizar no local correto e a transferência energética depende da distância entre ambas.

As aplicações das sondas são inúmeras. Entre elas estão: identificação de RFLP para estudos de evolução, mapeamento e relação espécie-específica, hibridização *in situ* (FISH) (descrito abaixo) e isolamento de genes. Além disso, as sondas podem diferenciar espécies por

BIOTECNOLOGIA MARINHA

meio de dois diferentes métodos de preparo: (i) mantendo a célula estudada intacta, possibilitando, inclusive, uma análise morfológica, como no caso da utilização de sondas marcadas com moléculas fluorescentes (ex.: FISH), que são hibridizadas com ribossomos presentes na amostra para detecção dos mesmos por meio de microscopia ou citometria de fluxo; (ii) extração dos ácidos nucleicos e aplicação das sondas para hibridização com ácido nucleico de interesse (microarranjo, biossensores), ou para amplificar regiões de barcode (através de RT-qPCR). Nesse caso, a detecção da sonda é feita por colorimetria ou eletroquímica.

2.8.1 HIBRIDIZAÇÃO *IN SITU* OU FISH

A técnica FISH (*Fluorescence In Situ Hybridization*) permite investigar a estrutura do padrão genético de uma população sem utilizar sequências específicas amplificadas por PCR e sem a necessidade de fazer cultivo de micro-organismos. Ela é capaz de detectar sequências de DNA ou RNA em uma seção tecidual diretamente e em cromossomo metafásico, sem alterar a morfologia da célula ou tecido, através da visualização direta através de microscópios óticos capazes de detectar fluorescência.

A FISH é baseada na formação de uma dupla fita híbrida devido à ligação do segmento-alvo de DNA ou RNA com uma sonda fita simples complementar marcada com fluorescência (dita marcação direta) ou com hapteno, uma molécula pequena que quando se liga a uma proteína leva a uma resposta imune (marcação indireta). A hibridização entre DNA alvo e sonda é averiguada ou pela detecção da fluorescência ou pela utilização de sistemas de detecção enzimática ou imunológica. Apesar de a metodologia de marcação direta ser mais rápida, a marcação indireta tem como vantagem ter um sinal mais amplificado devido à presença de vários anticorpos gerando esse sinal. Um exemplo da utilização de FISH é a produção de sondas específicas de rRNA que permitem a identificação filogenética de bactérias marinhas. Essas sondas são observadas por meio de microscopia confocal ou fluorescência. A sensibilidade de análises por FISH 16S rRNA, por exemplo, se dá pelo fato de haver um alto número de ribossomos por célula e cada ribossomo contém uma cópia de 16S rRNA, promovendo assim um forte sinal fluorescente.

2.8.2 MICROARRANJO (EM INGLÊS, *MICROARRAY*)

O microarranjo é uma técnica em que barcodes (sequências de DNA conhecidas) sintéticos estão aderidos em posições definidas em regiões microscópicas de uma superfície de vidro, formando assim uma matriz (Figura 3). Cada molécula de DNA aderida na matriz funciona como uma sonda para detectar expressão gênica, também chamado de transcriptoma ou transcritos de mRNA expressos por um grupo de genes. Se esses barcodes identificarem espécies, o microarranjo é também chamado de *filochip*.

As etapas para a realização de um experimento de microarranjo incluem: (i) produção de *microarranjo*; (ii) isolamento e preparação da amostra; (iii) hibridização e (iv) análise dos resultados. Antes da hibridização, os ácidos nucleicos alvos (amostra) são fragmentados para ficar em um tamanho determinado e posteriormente são marcados com molécula fluorescente.

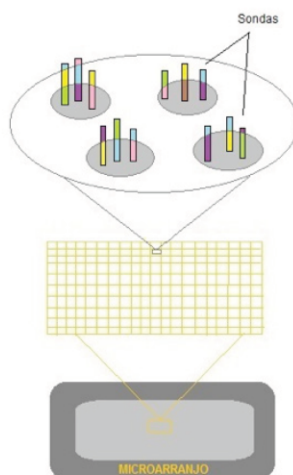
ÁCIDOS NUCLEICOS, ANÁLOGOS DE NUCLEOTÍDEOS, MARCADORES E SONDAS MOLECULARES


Figura 3. Ilustração esquemática de um sistema de microarranjo.

Esses segmentos, quando encontram uma sonda de sequência complementar na matriz, se ligam a ela (hibridizam). Então, esse sistema passa pela identificação em um equipamento que verificará se há fluorescência hibridizada nas sondas (se há expressão de um gene específico).

Filochips têm sido utilizados para identificar fitoplâncton como algas tóxicas e bactérias marinhas. Microarranjo já foi utilizado para detectar patógenos nas águas do rio Tibre, na Itália, para verificar a qualidade da água, por exemplo.

2.8.3 BIOSSENSORES

Os biossensores podem fazer a detecção de quimioluminescentes ou eletroquímicos por meio da técnica de hibridização sanduíche. Nesse caso, uma sonda, dita captadora, é aderida e imobilizada em uma superfície. A amostra de DNA ou RNA de interesse é adicionada ao sistema e liga-se nas sondas aderidas (quando complementares). Posteriormente, uma segunda sonda, chamada de sonda sinalizadora, liga-se também à sequência-alvo, formando um sanduíche. Um anticorpo para detectar a sonda sinalizadora é acoplado com uma enzima capaz de converter substratos inativos a um produto passível de detecção colorimétrica. Ou seja, cor indica hibridização das sondas com a amostra. Essa técnica é considerada sensível, com boa acurácia, versátil, rápida e barata. É utilizada para identificação de espécies e, assim como o microarranjo, para identificação de algas tóxicas, por exemplo.

3 | CONCLUSÕES

Os oceanos cobrem cerca de 70% da superfície da Terra, e deles mais de 240.000 es-

BIOTECNOLOGIA MARINHA

pécies de organismos já foram descritos. Tornou-se possível observar mais detalhadamente o tamanho de sua riqueza e diversidade após a descoberta da codificação da informação genética e os avanços em pesquisas nas áreas de biologia molecular e biotecnologia. Essas tecnologias são importantes ferramentas tanto para a caracterização e identificação das peculiaridades de espécies e populações, como para o aproveitamento de recursos valiosos ainda pouco explorados, como compostos e metabólitos secundários com potencial efeito farmacológico. No decorrer das últimas décadas, diversas metodologias foram sendo desenvolvidas a fim de aumentar a compreensão sobre a evolução dos organismos vivos, verificando suas diferenças e similaridades genéticas. O ambiente marinho é repleto de vida, com imensa biodiversidade e, embora tenha recebido mais atenção dos cientistas nos últimos anos, ainda é pouco conhecido, reservando um potencial inestimável de recursos a serem trabalhados.

REFERÊNCIAS

- Al-Samarai, F.R; Al-Kazaz, A.A. (2015) **Molecular Markers: An Introduction and Applications**. Academic Publishing House Researcher. ISSN: 2310-6255(Print); 2409-1332(online). Disponível em: <http://ejournal8.com/journals_n/1445499510.pdf>.
- Bergmann, W.; Feeney, R.J. (1950) The isolation of a new thymine pentoside from sponges. **J. Am. Chem. Soc.** 72: 2809-2810.
- Burton, R.S. (2009) Molecular Markers, Natural history and conservation of marine animals. **BioScience**. 59(10): 831-840. doi: 0.1525/bio.2009.59.10.5
- Chauhan, T.; Rajiv, K. (2010) Molecular markers and their applications in fisheries and aquaculture. **Advances in Bioscience and Biotechnology**. 1, 281-291. doi: 10.4236/abb.2010.14037.
- Felício, R.; Oliveira, A.L.L.; Deboni, H.M. (2012) Bioprospecção a partir dos oceanos: conectando a descoberta de novos fármacos aos produtos naturais marinhos. **Cienc. Cult.** [online]. 64 (3): 39-42.
- Féral, J.-P. (2002) How useful are the genetic markers in attempts to understand and manage marine biodiversity? **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**. 268(2): 121-145, ISSN 0022-0981. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022098101003823>>.
- Gruenthal, K.M; Acheson, L.K; Burton, R.S. (2007) Evidence for low connectivity among populations of the red abalone (*Haliotis rufescens*) in California. **Marine Biology**. 152: 1237-1248.
- Hoffman, J.L.; Clark, M.S; Amos, W; Peck, L. S. (2012) Widespread amplification of Amplified Fragment Length Polymorphisms (AFLPs) in marine Antarctic animals. **Polar Biol**. 35: 919-929.
- Huang, R-M; Chen, Y-N; Zeng, Z.; Gao, C-H; Su, X.; Pen, Y. (2014) Marine Nucleosides: Structure, Bioactivity, Synthesis and Biosynthesis. **Marine Drugs**. 12: 5817-5838.
- Hyde, J.R; Lynn, E.E.; Humphreys, R.Jr; Musyl, M.; West, A.P; Vetter, R. (2005) Shipboard identification of fish eggs and larvae by multiplex PCR, and description of fertilized eggs of blue marlin, shortbill spearfish, and wahoo. **Mar. Ecol. Prog. Ser.** 286: 269-277.
- Kochzius, M. et al. (2010) Identifying fishes through DNA barcodes and microarrays. **PLoS One**. 5 (9): e12620. ISSN 1932-6203. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20838643>>.
- Learn.Genetics – Genetic Science Learning Center. (2017) **DNA Microarray**. Disponível em: <<http://learn.genetics.utah.edu/content/microarray/>>.

ÁCIDOS NUCLEICOS, ANÁLOGOS DE NUCLEOTÍDEOS, MARCADORES E SONDAS MOLECULARES

- genetics.utah.edu/content/labs/microarray/>. Acesso em: 13 jun.
- Lorenz, T.C. (2012) Polymerase chain reaction: basic protocol plus troubleshooting and optimization strategies. **J Vis Exp**. 63: e3998. ISSN 1940-087X. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22664923>>.
- Lv, J. et al. (2014) Assessment of four DNA fragments (COI, 16S rDNA, ITS2, 12S rDNA) for species identification of the Ixodida (Acari: Ixodida). **Parasit Vectors** 7: 93. ISSN 1756-3305. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24589289>>.
- Magoulas, A.; Kotoulas, G.; Batargias, C.; Zouros, E. (1997) Genetic markers in marine biology and aquaculture research, when to use what. **Proceedings of the Symposium Genetics and Aquaculture in Africa**, Abidjan, 1-4.
- Maheswaran, M. (2004) Molecular markers: History, Features and Applications. **Advanced Biotech**. 17-24. Disponível em: <<http://online.anyflip.com/wxlk/yglm/mobile/index.html#p=1>>.
- Medlin, L.K. (2016) Mini review: Molecular techniques for identification and characterization of marine Biodiversity. **Ann. Mar. Biob. Res.** 3: 1015.
- Moradi, A.; Keyvanshokoh, S. (2013) Microsatellite DNA marker in aquatic organisms. **Scientific Journal of Biological Sciences** 2(9): 184-189.
- O'Connor, C. (2008) Fluorescence in situ hybridization (FISH). **Nature Education** 1(1): 171. Disponível em: <<https://www.nature.com/scitable/topicpage/fluorescence-in-situ-hybridization-fish-327>>.
- Okumus, I; Çiftci Y. (2003) Fish population genetics and molecular markers: II - Molecular markers and their applications in fisheries and aquaculture. **Turk J Fish Aquat Sci**. 3: 51-79.
- Raupach, M.J; Barco, A.; Steinke, D.; Beermann, J.; Laakmann, S.; Mohrbeck, I.; Neumann, H.; Kihara, T.C.; Pointer, K.; Radulovici, A.; Segelken-Voigt, A.; Wesse, C.; Knebelberger, T. (2015) The application of DNA barcodes for the identification of marine crustaceans from the North Sea and adjacent regions, **PLoS ONE**, 10(9): e0139421. doi: 10.1371/journal.pone.0139421
- Schlötterer, C. (2004) The evolution of molecular markers - just a matter of fashion? **Nat Rev Genet** 5(1): 63-69. ISSN 1471-0056. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14666112>>.
- Shank, T.M.; Halanych, K.M. (2007) Toward a mechanistic understanding of larval dispersal: insights from genomic fingerprinting of the deep-sea hydrothermal vent tubeworm *Riftia pachyptila*. **Marine Ecology** 28: 25-35. doi:10.1111/j.1439-0485.2007.00146.x
- Singh, U.; Deb, R.; Alyethodi, R.R; Alex, R; Kumar, S; Chakraborty, S; Sharma, A. (2014) Molecular markers and their applications in cattle genetic research: a review. **Biomarkers and Genomic Medicine**. 6(2): 49-58. doi: 10.1016/j.bgm.2014.03.001
- Sweijd, N.A; Bowie, R.C.K; Evans, B.S; Lopata, A.L. (2000) Molecular genetics and the management and conservation of marine organisms. **Hydrobiologia**. 420: 153-164.
- Vasavirama, K. (2013) Molecular probe and their applications. **International Journal of Life Science Biotechnology and Pharma Research**. 2(2). ISSN 2250-3137. Disponível em: <http://new.ijlbpr.com/jlbprad-min/upload/ijlbpr_51835623c403f.pdf>.
- Vos, P.; Hogers, R.; Bleeker, M.; Reijans, M.; van de Lee, T.; Hornes, M.; Frijters, A.; Pot, J.; Peleman, J.; Kuiper, M. (1995) AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. **Nucleic Acids Res**. 23(21): 4407-4414. ISSN 0305-1048. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7501463>>.
- Wu, S.; Xiong, J.; Yu, Y. (2015) Taxonomic resolutions based on 18S rRNA genes: a case study of subclass Copepoda. **PLoS One**. 10(6): e0131498. ISSN 1932-6203. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

BIOTECNOLOGIA MARINHA

pubmed/26107258>.

Zaha, A.; Ferreira, H.B.; Passaglia, L.M. (2014) **Biologia Molecular Básica**. 5 ed. Porto Alegre: Artmed.

RIBEIRO, N. S.**1. DADOS PESSOAIS**

Nome: Nicole Sartori Ribeiro

Local e data de nascimento: Porto Alegre, RS, Brasil, 29/08/1991

Endereço profissional: Av. Bento Gonçalves, 9500 Prédio 43431. Lab 213. Universidade Federal do Rio Grande do Sul – Campus do Vale

Telefone profissional: 3308-7766

E-mail: nicole.sari@hotmail.com

2. FORMAÇÃO:

Curso de graduação: Biomedicina na Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS, Brasil. Período: 2010-2014.

Título Trabalho de Conclusão de Curso: “Avaliação da expressão do transportador de cobre CTR1 em células de macrófagos infectados com Leveduras Patogênicas.”

Orientador: Charley Christian Staats

Cursos de pós-graduação: Mestrado *stricto sensu* em Biologia Celular e Molecular. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Brasil. Período: 2015-2017.

Título da dissertação: “Modulação da homeostase de zinco em *Acanthamoeba castellanii* como uma possível estratégia antifúngica.”

Orientador: Charley Christian Staats

Cursos de pós-graduação: Doutorado *stricto sensu* em Biologia Celular e Molecular. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Brasil. Período: 2017-atualmente.

Título da tese: “Metabólitos produzidos por bactérias marinhas com atividade antiformação de biofilme patogênico.”

Orientador: Alexandre José Macedo

3. FORMAÇÃO COMPLEMENTAR:

Graduação Sanduíche: Programa Ciências Sem Fronteiras – University of the Fraser Valley – UFV, Canadá. Período: 2013-2014.

4. ATUAÇÃO PROFISSIONAL:

Professora de Ensino Superior: Faculdade da Serra Gaúcha (FSG) – Caxias do Sul (RS), Brasil. Período: 2019-atualmente.

Cursos de atuação: Biomedicina e Medicina Veterinária

Disciplinas ministradas: Bioquímica Clínica, Imunologia Básica, Microbiologia Aplicada e Citologia, Histologia e Embriologia.

5. ORIENTAÇÕES

1. Carolina Kaplan Pereira. INFLUÊNCIA DO TABAGISMO NO ENVELHECIMENTO FACIAL EM MORADORES DA SERRA GAÚCHA – Jul 2021. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Biomedicina) - Faculdade da Serra Gaúcha. (Orientador).
2. Gabriela Toscan Mezari. O USO COMBINADO DE ANTIBIÓTICOS COM ÓLEOS ESSENCIAIS PARA O TRATAMENTO DE INFECÇÕES CAUSADAS POR *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* RESISTENTES - UMA REVISÃO INTEGRATIVA SISTEMATIZADA DA LITERATURA – Jul 2021. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Biomedicina) - Faculdade da Serra Gaúcha. (Orientador).
3. Sara Karoline Velho Ribeiro. CONDUTA ÉTICA NA PUBLICIDADE E PROPAGANDA EM CLÍNICAS DE BIOMEDICINA ESTÉTICA NO MUNICÍPIO DE CAXIAS DO SUL – RS – Jul 2021. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Biomedicina) - Faculdade da Serra Gaúcha. (Orientador).
4. Catrine Zangalli. VOLUME PLAQUETÁRIO MÉDIO (VPM) COMO UM BIOMARCADOR PROGNÓSTICO DE PACIENTES APÓS INFARTO AGUDO DO MIOCÁRDIO E ANGIOPLASTIA CORONÁRIA: UMA REVISÃO INTEGRATIVA SISTEMATIZADA – Dez 2020. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Biomedicina) - Faculdade da Serra Gaúcha. (Orientador).

5. Eduarda de Lima Ferreto. AVALIAÇÃO DOS MALEFÍCIOS DA DEFICIÊNCIA DA VITAMINA B12 EM DECORRÊNCIA DE DIETA VEGETARIANA OU VEGANA MATERNA DURANTE O PERÍODO GESTACIONAL: UMA REVISÃO SISTEMÁTICA – Dez 2020. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Biomedicina) - Faculdade da Serra Gaúcha. (Orientador).
6. Giulia Vieira Barazzetti - ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E ANTIBIOFILME DO EXTRATO DE TANSAGEM (*PLANTAGO MAJOR L.*) TESTADO EM *AGGREGATIBACTER ACTINOMYCETEMCOMITANS* E *STREPTOCOCCUS MUTANS* – Dez 2020. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Biomedicina) - Faculdade da Serra Gaúcha. (Orientador).
7. Júlia Gomerlato - PREVALÊNCIA DE TOXOPLASMOSE EM GESTANTES NO BRASIL: uma revisão sistemática – Dez 2020. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Biomedicina) - Faculdade da Serra Gaúcha. (Orientador).
8. Marcella Garibaldi Alves - AVALIAÇÃO DOS FATORES TROMBOFÍLICOS ASSOCIADOS À PRÉ-ECLÂMPSIA: UMA REVISÃO SISTEMÁTICA – Dez 2020. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Biomedicina) - Faculdade da Serra Gaúcha. (Orientador).
9. Taiana Mara Gueberto - CEFTAZIDIME/AVIBACTAM COMO OPÇÃO TERAPÊUTICA PARA O TRATAMENTO DE INFECÇÕES DO TRATO URINÁRIO: UMA REVISÃO DA LITERATURA – Jul 2020. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Biomedicina) - Faculdade da Serra Gaúcha. (Orientador).
10. Virginia Regla - ÓLEOS ESSENCIAIS E SUAS ATIVIDADES BIOLÓGICAS CONTRA BACTÉRIAS PATOGÊNICAS GRAM-POSITIVAS – Jul 2020. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Biomedicina) - Faculdade da Serra Gaúcha. (Orientador).

6. BANCAS

1. Caroline Gomes dos Passos. FREQUÊNCIA DE COINFECÇÃO TUBERCULOSE/HIV NO PERÍODO DE 2014 A SETEMBRO DE 2019 NO MUNICÍPIO DE CAXIAS DO SUL/RS – Dez 2019. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Biomedicina) - Faculdade da Serra Gaúcha.
2. Marina Soldera Scarabelot. PREVALÊNCIA DE SÍFILIS E FATORES ASSOCIADOS EM PACIENTES ATENDIDOS NO SISTEMA ÚNICO DE SAÚDE NA CIDADE DE SÃO MARCOS/RS – Dez 2019. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Biomedicina) - Faculdade da Serra Gaúcha.
3. Raquel Refosco Garcez. AVALIAÇÃO DA PREVALÊNCIA DO *DIABETES MELLITUS* E A PRESENÇA DA DOENÇA RENAL DO DIABETES – Dez 2019. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Biomedicina) - Faculdade da Serra Gaúcha.
4. Andressa Schiavini. AVALIAÇÃO DA INSUFICIÊNCIA RENAL CRÔNICA E PROBLEMAS CARDIOVASCULARES: UMA REVISÃO INTEGRATIVA SISTEMATIZADA – Jul 2020. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Biomedicina) - Faculdade da Serra Gaúcha.
5. Caroline Tartere. AVALIAÇÃO DA INTERFERÊNCIA DO JEJUM NA DOSAGEM DE EXAMES DE COLESTEROL TOTAL – Dez 2020. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Biomedicina) - Faculdade da Serra Gaúcha.
6. Daniele Herzer. *DIABETES MELLITUS* E SUA RELAÇÃO COM O AGRAVAMENTO DO QUADRO CLÍNICO EM PACIENTES INFECTADOS PELO SARS-COV-2: UMA REVISÃO SISTEMÁTICA - Dez 2020. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Biomedicina) - Faculdade da Serra Gaúcha.
7. Emanuele Marcon. PREVALÊNCIA E PERFIL DE RESISTÊNCIA BACTERIANOS DE AMOSTRAS DO TRATO RESPIRATÓRIO DE PACIENTES INTERNADOS

- EM UM HOSPITAL DA SERRA GAÚCHA – Dez 2020. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Biomedicina) - Faculdade da Serra Gaúcha.
8. Laura Machado Schvarstzhaupt. FREQUÊNCIA E QUANTIFICAÇÃO DAS CITOQUERATINAS 7, 18 E 19 EM BIÓPSIAS DE CÂNCER DE MAMA INVASORES NA SERRA GAÚCHA. – Jul 2020. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Biomedicina) - Faculdade da Serra Gaúcha.
 9. Jeniffer C. Erhart. SEXOLOGIA FORENSE – A INCLUSÃO DA CITOPATOLOGIA NOS EXAMES DE CORPO DE DELITO EM VÍTIMAS DE VIOLÊNCIA SEXUAL – Dez 2020. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Biomedicina) - Faculdade da Serra Gaúcha.
 10. Joice Nascimento. PREVALÊNCIA DE COLONIZAÇÃO NASAL POR *Staphylococcus aureus* EM ESTUDANTES DA ÁREA DA SAÚDE EM UM CENTRO UNIVERSITÁRIO DO SUL DO BRASIL – Dez 2020. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Biomedicina) - Faculdade da Serra Gaúcha.
 11. Michelis Guerra. AVALIAÇÃO DA POTABILIDADE DA ÁGUA PROVENIENTE DE FONTES ALTERNATIVAS DE CAPTAÇÃO E SUAS IMPLICAÇÕES A SAÚDE NA CIDADE DE CAMPESTRE DA SERRA, RS – Dez 2020. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Biomedicina) - Faculdade da Serra Gaúcha.
 12. Nathália Bonatto. AVALIAÇÃO DO DIABETES MELLITUS GESTACIONAL E AS COMPLICAÇÕES ENCONTRADAS EM NEONATOS: UMA REVISÃO SISTEMÁTICA – Jul 2020. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Biomedicina) - Faculdade da Serra Gaúcha.
 13. Rafaela Bratz. RELATO DE CASO DE DEFICIÊNCIA DE VITAMINA K EM NEONATO, SEXO MASCULINO, NASCIDO EM UM HOSPITAL DO RIO GRANDE DO SUL, BRASIL – Jul 2020. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Biomedicina) - Faculdade da Serra Gaúcha.

14. Tainá Testolin. UTILIZAÇÃO DAS BANDAS OLIGOCLONAIIS COMO DIAGNÓSTICO COMPLEMENTAR DA ESCLEROSE MÚLTIPLA: Uma Revisão Integrativa da Literatura – Dez 2020. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Biomedicina) - Faculdade da Serra Gaúcha.
15. Carla Nava. AVALIAÇÃO *In vitro* DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DO EXTRATO DE SEMENTE DE UVA CONTRA CEPAS DE *Staphylococcus aureus* e *Candida albicans* – Jul 2021. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Biomedicina) - Faculdade da Serra Gaúcha.
16. Letícia Bonetto. AVALIAÇÃO DO PERFIL NUTRICIONAL DE VEGETARIANOS DA REGIÃO DE CAXIAS DO SUL, RS. – Jul 2021. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Biomedicina) - Faculdade da Serra Gaúcha.
17. Marina Scola Kriger. O ESTRESSE COMO FATOR DE DISFUNÇÕES ESTÉTICAS CORPORAIS: UMA CORRELAÇÃO ENTRE O CORTISOL, A LIPODISTROFIA LOCALIZADA E O FIBROEDEMA GELÓIDE – Jul 2021. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Biomedicina) - Faculdade da Serra Gaúcha.
18. Tiago Paim Honorato. PREVALÊNCIA DE ENTEROPARASITÓSES EM CRIANÇAS COM IDADE PRÉ-ESCOLAR E AVALIAÇÃO DO NÍVEL DE CONHECIMENTO DOS EDUCADORES INFANTIS NO CONTROLE DESTAS PATOLOGIAS – Jul 2021. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Biomedicina) - Faculdade da Serra Gaúcha.

7. ARTIGOS E CAPÍTULOS DE LIVRO PUBLICADOS

1. REIS, S. V. D; RIBEIRO, N. S; ROCHA, D. A; FORTES, I. S; TRENTIN, D. D. S; ANDRADE, S. F et al. Antibacterial and antibiofilm activities of a disubstituted quinazoline compound against *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* Chem Biol Drug Des. 2020;96(6):1372-9. (Artigo)
2. RIBEIRO, N. S; LOGES, L. A.; MACEDO, A. J. ÁCIDOS NUCLÉICOS, ANÁLOGOS DE NUCLEOTÍDEOS, MARCADORES E SONDAS

- MOLECULARES. In: Fabiano Thompson;Cristiane Thompson. (Org.). BIOTECNOLOGIA MARINHA. 1ed.Rio Grande: FURG, 2020, v. 22, p. 112-129. (Livro)
3. RIBEIRO, NICOLE S.; DOS SANTOS, FRANCINE M.; GARCIA, ANE W. A.; FERRAREZE, PATRÍCIA A. G.; FABRES, LAURA F.; SCHRANK, AUGUSTO; KMETZSCH, LIVIA; ROTT, MARILISE B.; VAINSTEIN, MARILENE H.; STAATS, CHARLEY C. Modulation of Zinc Homeostasis in *Acanthamoeba castellanii* as a Possible Antifungal Strategy against *Cryptococcus gattii*. *Frontiers in Microbiology*, v. 8, p. 1626, 2017. 2. (Artigo)
 4. DOS SANTOS, FRANCINE MELISE; PIFFER, ALÍCIA CORBELLINI; SCHNEIDER, RAFAEL DE OLIVEIRA RIBEIRO, NICOLE SARTORI; GARCIA, ANE WICHINE ACOSTA; SCHRANK, AUGUSTO; KMETZSCH, LÍVIA; VAINSTEIN, MARILENE HENNING; STAATS, CHARLEY CHRISTIAN. Alterations of zinc homeostasis in response to *Cryptococcus neoformans* in a murine macrophage cell line. *Future Microbiology*, v. 12, p. 491-504, 2017. 3. (Artigo)
 5. Goldim, Mariana Pereira de Souza; Garcia, Cristina da Silva; de Castilhos, Cristina Dickie; Daitx, Vanessa Vitcoski; Mezzalira, Jamila; Breier, Ana Carolina; Cé, Jaqueline; Mello, Alexandre; Andrade, Carla Vieira; SARTORI, Nicole; Coelho, Janice Carneiro. Screening of high-risk Gaucher disease patients in Brazil using miniaturized dried blood spots and leukocyte techniques. *Gene (Amsterdam)*, v. 508, p. 197-198, 2012. (Artigo)

8. RESUMOS E TRABALHOS APRESENTADOS EM CONGRESSOS

1. XXIV Congreso Latinoamericano de de Microbiologia. Secondary metabolites from marine microorganisms with bioactivity against pathogenic bacteria. 2018. (Congresso).
2. Encontro da Rede Nacional de Educação e Ciência: Novos Talentos da Rede Pública. Curso de férias do PPGBCM Biot/UFRGS. 2016. (Encontro).

3. 28° Congresso Brasileiro de Microbiologia. Evaluation of copper transporter CTR1 in macrophages infected by *Cryptococcus neoformans* and *Candida albicans*. 2015. (Congresso).
4. XII International Meeting on Paracoccidioidomycosis. Evaluation of copper transporters expression in macrophages infected by *Cryptococcus neoformans* and *Candida albicans*. 2014. (Encontro).
5. XLI Annual Meeting of SBBq. Effect of Storage on the Activity of Beta-Galactosidase in DBS: Results After Five Years at 4°C. 2012. (Congresso).