



PAULA DE FRANÇA

**“INVESTIGAÇÃO GENÉTICA E FUNCIONAL DA PRODUÇÃO DE  
COMPOSTOS ANTIMICROBIANOS POR BACTÉRIAS ORIUNDAS  
DA ANTÁRTICA”**

**“GENETIC AND FUNCTIONAL EVALUATION OF PRODUCTION  
OF ANTIMICROBIAL COMPOUNDS BY BACTERIA FROM  
ANTARCTICA”**

CAMPINAS

2015





UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

Instituto de Biologia

PAULA DE FRANÇA

**“INVESTIGAÇÃO GENÉTICA E FUNCIONAL DA PRODUÇÃO DE  
COMPOSTOS ANTIMICROBIANOS POR BACTÉRIAS ORIUNDAS DA  
ANTÁRTICA”**

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Fabiana Fantinatti-Garboggini

Co-orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Marta Cristina Teixeira Duarte

**“GENETIC AND FUNCTIONAL EVALUATION OF PRODUCTION OF  
ANTIMICROBIAL COMPOUNDS BY BACTERIA FROM ANTARCTICA”**

Dissertação apresentada ao Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para obtenção do título de Mestra em Genética e Biologia Molecular, na área de Microbiologia.

Dissertation presented to the Biology Institute of the University of Campinas in partial fulfill of the requirements for the Degree of Master in Genetics and Molecular Biology, Microbiology area.

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO  
FINAL DA DISSERTAÇÃO DEFENDIDA PELA  
ALUNA PAULA DE FRANÇA E ORIENTADA PELA  
PROF<sup>a</sup>. DR<sup>a</sup>. FABIANA FANTINATTI-GARBOGGINI

*Fabiana Fantinatti Garboggini*

CAMPINAS  
2015

Ficha catalográfica  
Universidade Estadual de Campinas  
Biblioteca do Instituto de Biologia  
Mara Janaina de Oliveira - CRB 8/6972

F844i França, Paula, 1987-  
Investigação genética e funcional da produção de compostos antimicrobianos por bactérias oriundas da Antártica / Paula de França. – Campinas, SP : [s.n.], 2015.

Orientador: Fabiana Fantinatti Garboggini.  
Coorientador: Marta Cristina Teixeira Duarte.  
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. Bactérias. 2. Atividade antimicrobiana. 3. Concentração inibitória mínima. 4. 16S rRNA. 5. Policetídeo sintases. 6. Peptídeo sintases. I. Fantinatti-Garboggini, Fabiana. II. Duarte, Marta Cristina Teixeira. III. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. IV. Título.

Informações para Biblioteca Digital

**Título em outro idioma:** Genetic and functional evaluation of production of antimicrobial compounds by bacteria from Antarctica

**Palavras-chave em inglês:**

Bacteria  
Antimicrobial  
activity  
Minimum inhibitory  
concentration RNA,  
Ribosomal, 16S Polyketide  
synthases  
Peptide synthases

**Área de concentração:** Microbiologia

**Titulação:** Mestra em Genética e Biologia Molecular

**Banca examinadora:**

Fabiana Fantinatti Garboggini  
[Orientador] Laura Maria Mariscal  
Ottoboni

Suzan Pantatoto de Vasconcellos

**Data de defesa:** 28-01-2015

**Programa de Pós-Graduação:** Genética e Biologia Molecular

**Campinas, 28 de janeiro de 2015.**

BANCA EXAMINADORA

Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Fabiana Fantinatti-Garboggini (Orientadora)

Fabiana Fantinatti Garboggini

Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Laura Maria Mariscal Ottoboni

Laura M. M. Ottoboni

Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Suzan Pantaroto de Vasconcelos

Suzan Pantaroto de Vasconcelos

Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Suzete Aparecida Lanza Destéfano

\_\_\_\_\_

Prof. Dr. Michel Rodrigo Zambrano Passarini

\_\_\_\_\_



## RESUMO

Os micro-organismos associados ao continente Antártico apresentam populações diversas e metabolicamente ativas, porém o potencial farmacológico dos compostos obtidos pelos micro-organismos é pouco conhecido. As bactérias são importante fonte de compostos utilizados atualmente como antimicrobianos, e as principais vias de biossíntese de muitos antibióticos são catalisadas pelos genes PKS (Polyketide Synthases) e NRPS (Non Ribosomal Peptide Synthetases). O presente estudo teve como objetivo a avaliação genética e funcional da produção de compostos antimicrobianos obtidos de bactérias isoladas na Baía do Almirantado, Antártica, a identificação taxonômica das bactérias que apresentaram tal potencial e a identificação do perfil químico dos compostos antimicrobianos. O total de 153 bactérias foi isolado do ambiente antártico, 127 isolados apresentaram pelo menos um dos genes *PKSI*, *PKSII* e *NRPS*. Estes foram identificados através do sequenciamento parcial do gene RNA ribossomal 16S e pertencem a 28 gêneros distintos, sendo representantes dos Filos Proteobacteria, Firmicutes, Actinobacteria e Bacteroidetes. A avaliação funcional da produção de antimicrobianos foi realizada com o total de 76 isolados dos quais 30 isolados formaram halos de inibição frente a micro-organismos testes. Os extratos brutos obtidos foram avaliados quanto à concentração inibitória mínima (MIC) frente a oito micro-organismos não virulentos, e 18 extratos brutos apresentaram atividade inibitória, onde se destaca o extrato denominado E131, obtido da bactéria do gênero *Streptomyces*, que apresentou atividade bacteriostática frente *S. aureus* e *M. luteus*, e atividade bactericida frente a *C. albicans* e *B. subtilis*. Frente a micro-organismos isolados de amostras clínicas, 11 extratos brutos apresentaram atividade inibitória frente a quatro cepas de *Neisseria meningitides*, com MIC dos extratos brutos variando de 0,0313 mg.mL<sup>-1</sup> até 2,0 mg.mL<sup>-1</sup>. O extrato E46, obtido da bactéria *Pseudoalteromonas* sp., destacou-se quanto à atividade inibitória observada frente às quatro cepas avaliadas. Frente à cepa B4, destacam-se a atividade antimicrobiana dos extratos brutos obtido das bactérias *Pseudoalteromonas* sp. e *Pseudomonas azotoformans* CUG12536. Frente à cepa YUSA, destaca-se a atividade antimicrobiana observada pelo extrato bruto obtido da bactéria *Marinilactibacillus* sp., cuja atividade antimicrobiana foi relatada pela primeira vez neste gênero de bactéria. Os extratos brutos possuem em sua composição, compostos cuja atividade antimicrobiana é conhecida, como ácidos graxos e compostos cuja atividade antimicrobiana não está descrita na literatura. Os testes de fracionamento dos extratos frente a solventes de diferentes polaridades indicou que os extratos brutos são solúveis, em sua maioria, a solvente polar. Portanto, as bactérias isoladas da Antártica produzem compostos de interesse farmacológico e podem ser utilizadas como fonte de novos compostos. Tais resultados enfatizam a necessidade de mais estudos de bactérias associadas a ambientes extremos, como a Antártica.

**Palavras-chave:** Bactérias, Atividade Antimicrobiana, Concentração Inibitória Mínima, RNA Ribossomal 16S, Policetídeo Sintase, Peptídeos Sintase Não Ribossomal, Antártica.



## ABSTRACT

Microorganisms associated with the Antarctic continent have various and metabolically active populations, but the pharmacological potential of compounds obtained by microorganisms is poorly understood. Bacteria are an important source of compounds currently used as antimicrobial, major biosynthetic pathways of many antibiotics are catalyzed by the PKS genes (Polyketide Synthases) and NRPS (Non Ribosomal Peptide Synthetases). This study had the objective to genetic and functional evaluation of the antimicrobial activity of bacteria isolated in Admiralty Bay, Antarctica, and the taxonomic identification of bacteria that had such potential and identification of the chemical profile of antimicrobial compounds. The total of 153 bacteria was isolated from Antarctic environment, among the isolates, 127 isolates showed at least one of the genes *PKSI*, *PKSII* and *NRPS*. These were identified by partial sequencing of 16S ribosomal RNA gene and belong to 28 different genera, with representatives of the phyla Proteobacteria, Firmicutes, Actinobacteria and Bacteroidetes. The functional evaluation of the production of antibiotic was conducted with a total of 76 isolates including 30 isolates that formed inhibition halos against test microorganisms. The crude extracts were evaluated as the minimum inhibitory concentration (MIC) against eight non-virulent microorganisms, and 18 crude extracts showed activity, highlighting the so-called E131 extract, obtained from bacteria of the genus *Streptomyces*, which showed bacteriostatic activity against *S. aureus* and *M. luteus*, and bactericidal activity against *C. albicans* and *B. subtilis*. Faced with microorganisms isolated from clinical samples, 11 crude extracts showed inhibitory activity against four strains of *Neisseria meningitides*, with MIC ranging from 0.0313 mg.mL<sup>-1</sup> to 2.0 mg.mL<sup>-1</sup>. The E46 extract obtained from the bacterium *Pseudoalteromonas* sp., stood out as the inhibitory activity observed across the four evaluated strains. Faced with the strain B4, stand out the antimicrobial activity of crude extracts obtained from bacteria *Pseudoalteromonas* sp. and *Pseudomonas azotoformans* CUG12536. Against YUSA strain, *Marinilactibacillus* sp. crude extract showed antimicrobial activity, which was the first reported in this bacterial genus. The extracts have in their composition, antimicrobial compounds whose activity is known, such as fatty acids, and compounds whose antimicrobial activity is not described in the literature. Fractionation tests of extracts using solvents of different polarities, indicated that the crude extracts are soluble mostly the polar solvent. Therefore, the bacteria isolated from the Antarctic produce compounds of pharmacological interest and can be used as a source of novel compounds. These results highlight the need for more studies of bacteria associated with extreme environments, such as Antarctica.

**Keywords:** Bacteria, Antimicrobial Activity, Minimum Inhibitory Concentration, Ribosomal RNA 16S, Polyketide Synthase, Non Ribosomal Peptide Synthetases, Antarctica.



## SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS .....	xvii
LISTA DE FIGURAS .....	xix
LISTA DE TABELAS .....	xxv
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS .....	xxvii
1. INTRODUÇÃO .....	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	4
2.1. Antártica .....	4
2.2. Diversidade bacteriana na Antártica.....	6
2.3. Potencial biotecnológico dos micro-organismos do ambiente antártico .....	8
2.4. Policetídeos Sintases e Peptídeos Sintases Não Ribossomal .....	12
3. OBJETIVOS.....	16
3.1. Objetivo geral .....	16
3.2. Objetivos específicos.....	16
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	17
4.1. Isolamento, preservação e reativação dos isolados .....	17
4.2. Caracterização dos isolados por taxonomia clássica.....	17
4.3. Detecção de genes associados aos sistemas PKS-I, PKS-II e NRPS .....	18
4.3.1. Extração e quantificação do DNA genômico.....	18
4.3.2. Triagem gênica por PCR.....	19
4.4. Caracterização e identificação dos isolados .....	20
4.4.1. Amplificação do gene RNA ribossomal 16S de bactérias .....	20
4.4.2. Sequenciamento e análise de gene RNA ribossomal 16S.....	21
4.5. Avaliação qualitativa da produção de antimicrobianos para isolados de mesmo gênero... ..	22

4.5.1. Método do bloco de gelose .....	22
4.6. Obtenção dos extratos brutos.....	23
4.7. Avaliação da atividade antimicrobiana contra micro-organismos não virulentos.....	24
4.7.1. Triagem <i>in vitro</i> da atividade antimicrobiana dos extratos dos micro-organismos pelo método da microdiluição .....	25
4.7.2. Preparo de inóculos padronizados.....	25
4.7.3. Determinação da Concentração Mínima Inibitória (MIC) e Concentração Bactericida Mínima (MBC) pelo método da microdiluição .....	25
4.7.4. Leitura dos resultados .....	26
4.8. Avaliação da atividade antimicrobiana contra micro-organismos virulentos provenientes de amostras clínicas .....	27
4.8.1. Triagem qualitativa da atividade antimicrobiana.....	27
4.8.1.1. Método de disco-difusão em ágar .....	28
4.8.2. Avaliação quantitativa da atividade antimicrobiana .....	28
4.9. Identificação dos compostos presentes nos extratos brutos, com atividade antimicrobiana, através da técnica de Cromatografia Gasosa Acoplada a Detector de Massas (GC-MS).....	29
4.9.1. Fracionamento dos extratos brutos .....	30
5. RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	31
5.1. Isolamento, preservação e reativação dos isolados .....	31
5.2. Caracterização dos isolados por taxonomia clássica.....	33
5.3. Seleção de isolados com potencial biotecnológico para os sistemas PKS-I, PKS-II e NRPS. ....	33
5.4. Identificação dos isolados .....	35
5.4.1. Análise parcial da sequência do gene RNA ribossomal 16S .....	35

5.5. Avaliação qualitativa da produção de antimicrobianos para os isolados dos gêneros <i>Bacillus</i> , <i>Planococcus</i> , <i>Marinilactibacillus</i> , <i>Psychrobacter</i> , <i>Pseudomonas</i> , <i>Escherichia</i> , <i>Enterobacter</i> e <i>Pantoea</i> .....	42
5.6. Avaliação da atividade antimicrobiana .....	45
5.7. Avaliação da atividade antimicrobiana frente cepas virulentas .....	50
5.8. Identificação por taxonomia molecular dos isolados .....	54
5.9. Análise do perfil químico dos extratos brutos com atividade antimicrobiana .....	61
5.9.1. Fracionamento dos extratos brutos .....	82
6. CONCLUSÕES .....	84
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	86
ANEXO I. Descrição das características morfológicas, presença de genes e identificação em nível de gênero dos isolados.....	101
ANEXO II. Compostos identificados através de Cromatografia Gasosa acoplada ao espectômetro de massas dos extratos brutos obtidos de bactérias da Antártica e a atividade antimicrobiana associada aos compostos. ....	105



*Dedico a Deus e à minha família*



## **AGRADECIMENTOS**

À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Fabiana Fantinatti-Garboggini pela orientação e por propor novos desafios à minha carreira. Pela paciência, amizade e ensinamentos.

À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Marta Cristina Teixeira Duarte pela co-orientação e por ceder espaço do seu laboratório e o tempo da sua equipe, em especial a Renata, para me ensinar novas metodologias.

À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Laura Maria Mariscal Ottoboni pela participação e contribuição de enorme valor como membro das bancas do meu exame de qualificação e defesa.

À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Suzan Pantaroto de Vasconcellos pela participação como membro da banca de defesa e por imensa colaboração com a dissertação.

Ao Prof. Dr. Marcelo Lancellotti e sua equipe do Laboratório de Biotecnologia pela proposta de trabalhar com micro-organismos patogênicos que enriqueceram esse trabalho.

Ao Prof. Dr. Rodney Alexandre Ferreira Rodrigues pela colaboração e disponibilidade no desenvolvimento e na identificação do perfil químico dos extratos brutos.

Aos colegas e amigos da Divisão de Recursos Microbianos, por dividir essa experiência e pela ajuda nos experimentos. Em especial, agradeço às técnicas Milena, Viviane, Samantha e Éricka, por me ensinar tanto e por se tornarem pessoas importantes na minha vida.

Ao grupo de pesquisa da Prof<sup>a</sup>. Fabiana, em especial a Bárbara, Cláudia, Julia, Bianca e Rafael pela colaboração e amizade.

Ao CPQBA, em especial as equipes da Divisão de Química de Produtos Naturais e a Divisão de Microbiologia, por ceder espaço e material para os meus experimentos.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de mestrado e à Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) agradeço pelo suporte financeiro do projeto.

À UNICAMP, em especial ao Instituto de Biologia, e ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, pela estrutura cedida, eficiência e pelo aprendizado.

À minha família, meus pais Silvia e Jorge, meus irmãos Bruna e Felipe, e ao meu namorado Raoni, que com paciência me auxiliaram carinhosamente nesse percurso, e confiaram em mim, mesmo quando eu não confiava.

Aos meus amigos, Ângela, Bianca, Pamela e Michell, que mesmo longe estavam presentes de alguma forma me acompanhando e dando força.

A Deus, minha fortaleza.

A todos que, de alguma forma, contribuíram para o desenvolvimento dessa dissertação, como a querida Sara Bareilles, e estiveram me apoiando nesse momento da minha vida.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Mapa representativo da Antártica, com delimitação da Frente Polar Antártica (Convey et al., 2014). .....	6
<b>Figura 2.</b> Exemplos de policetídeos oriundos de metabólicos secundários. O nome do policetídeo e a sua atividade biológica estão indicadas (Staunton e Weissman, 2001). .....	13
<b>Figura 3.</b> Representação do Continente Antártico e indicação da Ilha do Rei George, onde foi realizada a coleta do presente estudo. Fonte: Convey et al., 2010.....	31
<b>Figura 4.</b> Material coletado no continente Antártico na expedição verão 2010 e utilizado para o isolamento de bactérias.....	32
<b>Figura 5.</b> Distribuição do número de isolados por meio de cultivo para cada amostra coletada.....	33
<b>Figura 6.</b> Incidência de cada gene <i>NRPS</i> , <i>PKS-I</i> e <i>PKS-II</i> , e dos três genes nas 127 bactérias isoladas. ....	35
<b>Figura 7.</b> Distribuição das bactérias isoladas que incluem cada Filo, de acordo com a análise parcial da sequência do gene RNA ribossomal 16S, totalizando 28 gêneros distintos. ....	36
<b>Figura 8.</b> Distribuição dos gêneros do Filo Firmicutes, de acordo com a análise parcial da sequência do gene RNA ribossomal 16S, totalizando 24 isolados.....	37
<b>Figura 9.</b> Distribuição dos gêneros do Filo Actinobacteria, de acordo com a análise parcial da sequência do gene RNA ribossomal 16S, totalizando 15 isolados.....	38
<b>Figura 10.</b> Distribuição dos gêneros do Filo Proteobacteria, de acordo com a análise parcial da sequência do gene RNA ribossomal 16S, totalizando 82 isolados.....	39
<b>Figura 11.</b> Isolados que apresentaram inibição contra os micro-organismos indicadores nas intensidades Baixa, Moderada e Alta. ....	45
<b>Figura 12.</b> Árvore filogenética baseada em análise filogenética da sequência do gene RNA ribossomal 16S de bactérias pertencentes ao gênero <i>Pseudoalteromonas</i> isoladas da Antártica. Distâncias evolutivas baseadas no modelo de Kimura 2-p e construção da árvore pelo método Neigbor-Joining, com valores de <i>bootstrap</i> de 1000 repetições. <i>Pseudomonas antarctica</i> foi utilizada como <i>outgroup</i> .....	55

- Figura 13.** Árvore filogenética baseada em análise filogenética da sequência do gene RNA ribossomal 16S de bactérias pertencentes ao gênero *Pseudomonas* isoladas da Antártica. Distâncias evolutivas baseadas no modelo de Kimura 2-p e construção da árvore pelo método Neigbor-Joining, com valores de *bootstrap* de 1000 repetições. *Rhizobacter dauci* foi utilizada como *outgroup*. ..... 56
- Figura 14.** Árvore filogenética baseada em análise filogenética da sequência do gene RNA ribossomal 16S da bactéria pertencente ao gênero *Stenotrophomonas* isolado da Antártica. Distâncias evolutivas baseadas no modelo de Kimura 2-p e construção da árvore pelo método Neigbor-Joining, com valores de *bootstrap* de 1000 repetições. *Thermomonas brevis* foi utilizada como *outgroup*. ..... 57
- Figura 15.** Árvore filogenética baseada em análise filogenética da sequência do gene RNA ribossomal 16S da bactéria pertencentes ao gênero *Marinomonas* isoladas da Antártica. Distâncias evolutivas baseadas no modelo de Kimura 2-p e construção da árvore pelo método Neigbor-Joining, com valores de *bootstrap* de 1000 repetições *Corallomonas stylophorae* foi utilizado como *outgroup*. ..... 57
- Figura 16.** Árvore filogenética baseada em análise filogenética da sequência do gene RNA ribossomal 16S de bactérias pertencentes ao Filo Actinobacteria isoladas da Antártica. Distâncias evolutivas baseadas no modelo de Kimura 2-p e construção da árvore pelo método Neigbor-Joining, com valores de *bootstrap* de 1000 repetições. *Streptacidiphilus carbonis* foi utilizado como *outgroup*. ..... 58
- Figura 17.** Árvore filogenética baseada em análise filogenética da sequência do gene RNA ribossomal 16S de bactérias pertencentes aos Filos Bacteroidetes e Firmicutes isoladas da Antártica. Distâncias evolutivas baseadas no modelo de Kimura 2-p e construção da árvore pelo método Neigbor-Joining, com valores de *bootstrap* de 1000 repetições..... 59
- Figura 18.** Árvore filogenética baseada em análise filogenética da sequência do gene RNA ribossomal 16S da bactéria pertencente ao Filo Firmicutes, gênero *Marinilactibacillus*, isolado da Antártica. Distâncias evolutivas baseadas no modelo de Kimura 2-p e construção da árvore pelo método Neigbor-Joining, com valores de *bootstrap* de 1000 repetições. *Streptomyces hydrogenans* foi utilizada como *outgroup*. ..... 60
- Figura 19.** Cromatograma obtido por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas, obtido com extrato bruto denominado N, considerado controle negativo. Pico 1:

Pirrol [1,2-a]pirazina-1,4-diona,hexahidro; Pico 2: Pirrol[1,2-a]pirazina-1,4-diona,hexahidro-3-(2-metilpropil); Pico 3: Pirrol [1,2-a]pirazina-1,4-diona,hexahidro-3-(fenilmetil)..... 62

**Figura 20.** Cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massas dos extratos brutos denominados E6, E46, obtidos do gênero *Pseudoalteromonas*, e N. Pico 1- Pirrol[1,2-a]pirazina-1,4-diona,hexahidro; Pico 2- 13-metil-oxaciclotetradecano-2,11-diona; Pico 3- Ácido pentadecanóico; Pico 4- Pirrol[1,2-a]pirazina-1,4-diona, hexahidro-3-(2-metilpropil); Pico 5- Ácido Z-7-hexadecanóico; Pico 6- Ácido n-hexadecanóico; Pico 7- Ácido pentadecanóico; Pico 8- Ácido 9-hexadecanóico; Pico 9- Ácido oléico; Pico 10- Pirrol[1,2-a]pirazine-1,4-diona, hexahidro-3-(fenilmetil)..... 64

**Figura 21.** Cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massas dos extratos brutos denominados E44, E53, E76, obtidos do gênero *Pseudoalteromonas*, e N. Pico 1- 2,4-imidazolidinadiona,5-metil-, Pico2- 3-piridinacarboxamida, Pico 3- 2H-indol-2-one-1,3-dihidro, Pico 4- Pirrol[1,2-a]pirazina-1,4-diona, hexahidro, Pico 5- Pirrol[1,2-a]pirazina-1,4-dione,hexahidro-3-(2-metilpropil), Pico 6- ácido Z-11-hexadecanóico, Pico 7- ácido n-hexadecanóico, Pico 8 - Não identificado, Pico 9- Pirrol[1,2-a]pirazina-1,4-diona,hexahidro-3-(fenilmetil), Pico 10- fenol-2,4-bis(1-metil-1-feniletil) ..... 67

**Figura 22.** Cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massas dos extratos brutos denominados E5, E144, E146, obtidos do gênero *Pseudomonas*, e N. Pico 1- 2-aminofenol, Pico 2- Etanol,2-(2-butoxi)etoxi-, Pico 3- 2,4-imidazolidinadiona,5-metil-, Pico 4- Pirrol[1,2-a]pirazina-1,4-diona,hexahidro-, Pico 5- ácido ftálico,isobutil octiléster, Pico 6- ácido 1,2-benzenedicarboxílico mono(2-etilhexil)éster, Pico 7- Pirrol[1,2-a]pirazina-1,4-diona, hexahidro-3-(2-metilpropil), Pico 8- ácido Z-11-hexadecanóico, Pico 9- ácido n-hexadecanóico, Pico 10- enxofre octaatômico cíclico, Pico 11- 1,4-benzenodiamina,N-(1-metiletil)-N'-fenil, Pico 12- Não identificado, 13- Não identificado, 14- Não identificado, Pico 15- benzenamina,4,4'-(1,2-etenodil)bis-, Pico 16- Pirrol[1,2-a]pirazina-1,4-diona,hexahidro-3-(fenilmetil), Pico 17- fenol-2,4-bis(1-metil-1-feniletil). ..... 69

**Figura 23.** Cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massas dos extratos brutos denominados E50, obtido da espécie *Stenotrophomonas rhizophila*, e N. Pico 1- Pirrol[1,2-a]pirazina-1,4-diona, hexahidro-; Pico 2- ácido pentadecanóico; Pico 3- Pirrol[1,2-a]pirazina-1,4-diona, hexahidro-3-(2-metilpropil); Pico 4- ácido Z-11-hexadecanóico; Pico

5- ácido n-hexadecanóico; Pico 6- 1-hexadecanol; Pico 7- ácido Z-11-tetradecanóico; Pico 8- Pirrol[1,2-a]pirazina-1,4-diona, hexahidro-3-(fenilmetil)..... 70

**Figura 24.** Cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massas dos extratos brutos denominados E38, obtido da espécie *Marinomonas polaris*, e N. Pico 1- 2,4-imidazolidinadiona, 5-metil-; Pico 2- 3-piridinacarboxamida; Pico 3- 1H-indol,2,3-dihidro-4-metil-; Pico 4- Pirrol[1,2-a]pirazina-1,4-diona,hexahidro-; Pico 5- Oxaciclotetradecano-2-ona; Pico 6- ácido pentadecanóico; Pico 7- Pirrol[1,2-a]pirazina-1,4-diona,hexahidro-3-(2-metilpropil); Pico 8- ácido 9-hexadecanóico; Pico 9- ácido n-hexadecanóico; Pico 10- ácido 14-pentadecanóico; Pico ácido 11- heptadecanóico; Pico 12- ácido octadecanóico; 13- Pirrol[1,2-a]pirazina-1,4-diona, hexahidro-3-(fenilmetil)..... 71

**Figura 25.** Cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massas dos extratos brutos denominados E128, E131, obtidas do gênero *Streptomyces*, e N. Pico 1- 2,4-Imidazolidinadiona,5-metil-; Pico 2- Trans-1,10-dimetil-tras-9-decalinol-; Pico 3- Benzene,1-(5,5-dimetil-1-ciclopenteno-1-il)-2-metoxi-; Pico 4- 1-Ciclohepteno-1, 4-dimetil-3-(2-metil-1-propeno-1-il)-4-vinil-; Pico 5- Ácido tetradecanóico; Pico 6- Pirrol[1,2-a]pirazina-1,4-diona, hexahidro-; Pico 7- Ácido pentadecanóico; Pico 8- Pirrol[1,2-a]pirazina-1,4-diona, hexahidro-3-(2-metilpropil); Pico 9- Ácido Z-11-hexadecanóico; Pico 10- Ácido n-hexadecanóico; Pico 11- 1,4- Benzenodiamina, N-(1-metiletil)-N'-fenil; Pico 12 e Pico 13- Não identificados; Pico 14- Pirrol[1,2-a]pirazina-1,4-diona, hexahidro-3-(fenilmetil). ..... 73

**Figura 26.** Cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massas dos extratos brutos denominados E136, obtido da espécie *Saccharopolyspora gregorii*, e N. Pico 1- Etanol, 2-(2-butoxi)etoxi-; Pico 2- 2-Pirrolidiona; Pico 3- 2,4-Imidazolidinadiona,5-metil-; Pico 4- Fenol,2-metil-5-(1-metiletil)-; Pico 5- Trans-1,10-dimetil-trans-9-decalol-; Pico 6- Ácido tetradecanóico; Pico 7- Pirrol[1,2-a]pirazina-1,4-diona,hexahidro-; Pico 8- Ácido pentadecanóico; Pico 9- Pirrol[1,2-a]pirazina-1,4-diona,hexahidro-3-(2-metilpropil); Pico 10- Ácido n-hexadecanóico; Pico 11- Ácido heptadecanóico; Pico 12- ácido tridecanóico; Pico 13- Não identificado; Pico 14- Ácido decanedióico bis(2-etilhexil) éster; Pico15- Pirrol[1,2-a]pirazina-1,4-diona, hexahidro-3-(fenilmetil)..... 75

**Figura 27.** Cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massas dos extratos brutos denominados E108, obtido da espécie *Carnobacterium divergens*, e N. Pico 1- Pirrol[1,2-

a]pirazina-1,4-diona,hexahidro-; Pico 2- Pirrol[1,2-a]pirazina-1,4-diona,hexahidro-3-(2-metilpropil); Pico 3- Não identificado; 4-Pirrol[1,2-a]pirazina-1,4-diona,hexahidro-3-(fenilmetil)..... 76

**Figura 28.** Cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massas dos extratos brutos denominados, E61, obtido da espécie *Planococcus rifitiensis*, e E114, obtido da espécie *Planococcus donghaensis*, e N. Pico 1- Feniletil álcool; Pico 2- 2(1H)-Piridiona,3-metil-; Pico 3- Etanol,2-(2-butoxi)toxi- ; Pico 4- 2,4-Imidazolidinadiona,5-metil-; Pico 5- 5,6-Dihidro-6-metiluracil; Pico 6- Dietil ftalato; Pico 7- Pirrol[1,2-a]pirazina-1,4-diona,hexahidro-; Pico 8- Pirrol[1,2-a]pirazina-1,4-diona,hexahidro-3-(2-metilpropil); Pico 9- 1,4- Benzenodiamina,N-(1-metiletil)-N'-fenil; Pico 10- Não identificado; Pico 11- Pirrol[1,2-a]pirazina-1,4-diona,hexahidro-3-(fenilmetil). ..... 78

**Figura 29.** Cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massas dos extratos brutos denominados E111, obtido da espécie *Algoriphagus aquamarinus*, e N. Pico 1- 2,4-Imidazolidinadiona; 5-metil-, Pico 2- Pirrol[1,2-a]pirazina-1,4-diona hexahidro-; Pico 3- Ácido pentadecanóico; Pico4 - Pirrol[1,2-a]pirazina-1,4-diona,hexahidro-3-(2-metilpropil); Pico 5- Ácido Z-11-hexadecanóico; Pico 6 – Ácido n-hexadecanóico; Pico 7- Ciclohexano-1-(ciclohexilmetil)2-etil-,trans-metil; Pico 8- 2,5-Piperazinadiona,3,6-bis(2-metilpropil)-; Pico 9-Pirrol[1,2-a]pirazina-1,4-diona,hexahidro-3-(fenilmetil)..... 79

**Figura 30.** Cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massas dos extratos brutos denominados E118 e E65, obtidos da espécie *Marinilactibacillus piezotolerans*, e N. Pico 1- 2,4-Imidazolidinadiona,5-metil-; Pico 2- Pirrol[1,2-a]pirazina-1,4-diona,hexahidro-; Pico 3- o-ciclopentil S-2(diisopropilamino)etil metilfosfonotiolato; Pico 4- Não identificado; Pico 5- Pirrol[1,2-a]pirazina-1,4-diona,hexahidro-3-(2-metilpropil); Pico 6- Não identificado; Pico 7-Pirrol[1,2-a]pirazina-1,4-diona,hexahidro-3-(fenilmetil). ..... 80



## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Escala de classificação de halos de inibição sugerida por Matsuura (2004) .....	23
<b>Tabela 2.</b> Isolados de bactérias selecionados para a produção de extrato bruto.....	41
<b>Tabela 3.</b> Isolados de bactérias selecionados para a avaliação qualitativa da produção de antimicrobianos .....	42
<b>Tabela 4.</b> Tipo de inibição gerada por isolados de bactérias frente aos micro-organismos indicadores avaliados no Teste do Bloco de Gelose, após 96 horas.....	44
<b>Tabela 5.</b> Avaliação da atividade antimicrobiana, pelo Método de Micro-diluição, de extratos brutos obtidos por bactérias isoladas do ambiente Antártico contra micro-organismos indicadores. ....	49
<b>Tabela 6.</b> Inibição de cepas virulentas a partir de método de disco-difusão em ágar com extratos obtidos de bactérias da Antártica. Presença (+) e Ausência (-) de halos de inibição. ....	53
<b>Tabela 7.</b> Avaliação da atividade antimicrobiana de extratos brutos frente a <i>Neisseria meningitidis</i> , pelo método de Micro-diluição.....	54
<b>Tabela 8.</b> Balanço de massas do fracionamento dos extratos brutos utilizando três solventes de diferentes polaridades. ....	83



## LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

<b>° C</b>	Graus Celsius
<b>µL</b>	Microlitros
<b>16S rRNA</b>	RNA ribossomal 16S
<b>ASW</b>	<i>Artificial Sea Water</i> (Água do mar artificial)
<b>ATCC</b>	<i>Amercian Type Culture Collection</i>
<b>CAPES</b>	Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
<b>CBM</b>	Concentração Bactericida Mínima
<b>CBMAI</b>	Coleção Brasileira de Micro-organismos de Ambiente e Indústria
<b>cm</b>	Centímetros
<b>CPQBA</b>	Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas Biológicas e Agrícolas
<b>DMSO</b>	Dimetilsulfóxido
<b>DNA</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>dNTP</b>	Desoxirribonucleotídeo trifosfato
<b>DRM</b>	Divisão de Recursos Microbianos
<b>EDTA</b>	Ácido etilenodiamino tetracético
<b>FAPESP</b>	Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo
<b>h</b>	Hora
<b>IO/USP</b>	Instituto Oceanográfico / Universidade de São Paulo
<b>kDa</b>	Quilodalton
<b>KS</b>	Cetosintase
<b>M</b>	Molar
<b>MEGA</b>	<i>Molecular Evolutionary Genetics Analysis</i>
<b>mg</b>	Miligrama
<b>MgCl<sub>2</sub></b>	Cloreto de Magnésio
<b>min</b>	Minuto
<b>mL</b>	Mililitro
<b>mm</b>	Milímetro

<b>mM</b>	Milimolar
<b>NA</b>	<i>Nutrient Agar</i>
<b>ng</b>	nanogramas
<b>NRPS</b>	<i>Non Ribosomal Peptide Synthetases</i> (Peptídeo Sintases Não Ribossomal)
<b>pb</b>	Pares de bases
<b>PCR</b>	<i>Polimerase Chain Reaction</i> (Reação de polimerase em cadeia)
<b>pH</b>	Potencial hidrogeniônico
<b>PKS</b>	<i>Polyketide Synthases</i> (Policetídeos Sintases)
<b>RDP</b>	<i>Ribosomal Database Project</i>
<b>RNA</b>	Ácido ribonucleico
<b>rRNA</b>	Ácido ribonucleico ribossomal
<b>RNase</b>	Ribonuclease
<b>rpm</b>	Rotações por minuto
<b>SDS</b>	Dodecil sulfato de sódio
<b>SET</b>	Tris-Salt-EDTA
<b>T</b>	Linhagem tipo
<b>TIC</b>	<i>Total Ion Chromatogram</i>
<b>TSA</b>	Tryptone Soya Broth
<b>UFRJ</b>	Universidade Federal do Rio de Janeiro
<b>UNICAMP</b>	Universidade Estadual de Campinas
<b>V</b>	Volts

# 1. INTRODUÇÃO

---

O continente antártico contém alguns dos mais fortes gradientes ambientais no planeta. Os ambientes terrestres e aquáticos não marinhos englobam o continente Antártico e a Península, que incluem os vários arquipélagos do arco Scotia e as sub-Ilhas da Antártica. O ambiente marinho engloba todo o Oceano Antártico, formado por províncias do sul dos Oceanos Atlântico, Índico e Pacífico, e é limitada a norte pela posição média da Frente Polar Antártica (Convey et al., 2014).

Os ecossistemas no continente antártico apresentam diversas condições ambientais que variam entre os desertos polares, incluindo o gelo do continente e água doce, a lagos hipersalinos e sua capa de gelo, até as pastagens e lagos eutróficos. Os ecossistemas marinhos variam de regiões costeiras rasas às profundezas abissais do oceano aberto, incluindo áreas livres de gelo até áreas cobertas de gelo permanente, variando quando a complexidade dos habitats de altamente diversificada a habitats muito simples (Thomas et al., 2008).

Neste ambiente extremo, poucos estudos têm investigado os micro-organismos que habitam este ambiente, sendo que as associações entre micro-organismos e invertebrados são pouco estudadas. A maioria dos esforços de pesquisa tem incidido sobre a água do mar, o gelo e comunidades microbianas do sedimento do ambiente antártico (Webster; Browman, 2007). O interesse em organismos marinhos continua a crescer, pois sedimentos e macro-organismos tem se tornado uma incrível fonte de bactérias e fungos (Blunt et al., 2008) e um elevado número de bactérias e cianobactérias associadas a esponjas do ambiente marinho está relacionada à fonte de antibióticos e outros componentes bioativos (Gandhimathi et al., 2008). Pouco é conhecido sobre a produção de antibióticos de bactérias do Ártico e da Antártica, o que sugere que os ambientes polares podem ser fonte de novos compostos bioativos (Wietz et al., 2012).

Os ambientes extremos tem sido alvo de interesse para a busca de novas moléculas com atividades biológicas únicas. Micro-organismos têm sido isolados da Antártica a fim de obter novos biossurfactantes, enzimas, compostos antimicrobianos, antitumorais e

antioxidantes (Liu et al., 2013; Jadhav et al., 2013; Papa et al., 2013; Asencio et al., 2014; Henriquez et al., 2014).

Apesar do sucesso da descoberta dos antibióticos, e os avanços nas técnicas de sua produção, as doenças infecciosas continuam a ser a segunda principal causa de morte no mundo, e as infecções bacterianas causam aproximadamente 17 milhões de mortes por ano, afetando principalmente crianças e os idosos. A automedicação e excesso de antibióticos é outro fator importante que contribui para a resistência, reduzindo a vida útil do antibiótico, causando assim, a necessidade constante para a pesquisa e desenvolvimento de novos antibióticos (Procópio et al., 2012).

As Actinobacterias têm provado ser uma fonte de produtos naturais biologicamente ativos, especialmente àqueles pertencentes ao gênero *Streptomyces*, que são amplamente utilizados na produção comercial de diferentes compostos clinicamente importantes (Busti et al., 2006). Novos antibióticos foram isolados de *Streptomyces* marinhos como enterocina, actinofenol, o antibiótico macrolactâmico maltofilina e icarcegamicina, o ácido fenazina safanico e 1,6-dihidroxifenazens, piridindolol, elaiomicina e o dicetopiperazina, 1-N-metil-albonoursina (Fiedler et al., 2005).

Bactérias do gênero *Streptomyces* possuem capacidade para produzir metabólitos secundários bioativos, tais como antifúngicos, antivirais, antitumorais, anti-hipertensivos, agentes imunossupressores, e especialmente antibióticos. A produção da maioria dos antibióticos é espécie específica, e esses metabólitos secundários são importantes para as espécies de *Streptomyces*, a fim de competir com outros micro-organismos que entram em contato, mesmo dentro do mesmo gênero (Procópio et al., 2012).

Em ambientes marinhos da Antártica, micro-organismos dos Filos Actinobacteria e Proteobacteria apresentaram atividade antimicrobiana contra os indicadores *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, *Micrococcus luteus* e *Bacillus subtilis*. A identificação de micro-organismos oriundos da Antártica, através de taxonomia polifásica, indicou a presença de 16 isolados pertencentes aos gêneros *Pseudomonas*, *Pseudoalteromonas*, *Arthrobacter*, *Janibacter*, *Nesterenkonia* e *Rhodococcus* (Lo Giudice et al., 2007)

Estudos evidenciam a atividade antimicrobiana de bactérias obtidas de esponjas marinhas da Antártica frente a *Burkholderia cepacia* complex, um patógeno oportunista da fibrose cística, que apresenta resistência a diversos tipos de drogas antimicrobianas utilizadas atualmente. Papaleo e colaboradores (2011) obtiveram 15 gêneros distintos de bactérias, destacaram-se os gêneros *Pseudoalteromonas*, *Arthrobacter* e *Psychrobacter*. Os compostos antimicrobianos responsáveis pela inibição do patógeno são semelhantes aos Compostos Orgânicos Voláteis (COVs), que não foram identificados. Outro estudo também associou a atividade inibitória a compostos orgânicos voláteis (COV), e foi parcialmente dependente do meio de crescimento que foram utilizados para crescimento das estirpes da Antártica (Orlandini et al., 2014). A análise comparativa dos genomas anotados das cepas de *Psychrobacter* que apresentaram atividade antimicrobiana apresentou diferenças em termos de conteúdo genômico global, como os conjuntos de genes compartilhados, e permitiu a identificação de agrupamentos de genes hipoteticamente envolvidos na biossíntese de compostos antimicrobianos (Fondi et al., 2014).

Muitos metabólitos secundários com atividade antimicrobiana produzidos por bactérias são sintetizados através de vias que envolvem policetídeos sintases (PKS) e/ou não-ribossomal peptídeo sintase (NRPS) (Bredholdt et al., 2007). Atualmente, a compreensão da biossíntese do complexo de produtos naturais, tanto no nível genético quanto químico, é centrada nos produtos produzidos pelos sistemas PKS e NRPS (Salomon et al., 2004).

Os produtos dessas vias são muito diferentes quanto a estrutura e função, tendo em comum uma semelhança colinear para permitir variabilidade de atividade enzimática, que ocorrem de uma maneira ordenada sobre proteínas multifuncionais. Estas enzimas estão organizadas de forma modular, e usam domínios específicos para sequencialmente catalisar a condensação de simples ácidos carboxílicos (PKS) ou aminoácidos (NRPS). Cada módulo em um *cluster* é responsável pela extensão da cadeia através do reconhecimento, ativação e incorporação de substratos específicos. A diversidade estrutural é introduzida através da variação das combinações e permutações de ambos os domínios (Salomon et al., 2004).

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

---

### 2.1. ANTÁRTICA

A Antártica está dividida em duas porções terrestres, o continente e as penínsulas, que possuem subilhas e arquipélagos. O ambiente Antártico é diversificado, e possui ecossistemas como desertos polares, pastagens, o gelo do continente, lagos hipersalinos e lagos eutróficos (Thomas et al., 2008).

O ambiente marinho abrange todo o Oceano Antártico, formado por províncias do sul dos Oceanos Atlântico, Índico e Pacífico, que é limitado ao norte pela posição média da Frente Polar Antártica. Os ecossistemas marinhos vão desde regiões costeiras rasas até profundidades abissais do oceano aberto, de áreas livres de gelo até áreas permanentemente cobertas de gelo. (Figura 1) (Convey et al., 2014).

O ambiente terrestre da Antártica exibe gradiente de formação do solo, o qual é classificado segundo Fogg (1998) em três tipos de solo: (1) Solo de Tundra, presente nas ilhas marítimas e subantárticas, (2) Solos Polares Desérticos, presente na região da costa da Antártica e (3) Solos Desérticos Gelados, presente no restante do continente.

Os litossolos são resultantes do intemperismo químico ou fragmentação por meio mecânico. Os processos químicos e o intemperismo biológico, causados por microorganismos, podem levar à formação de solos frios desérticos minerais, onde a transferência e acúmulo de sal são fenômenos importantes. A partir desses fenômenos, os processos biológicos aumentam a sua importância, pois aumentam o teor húmico do solo e criam os Solos de Tundra. Estes processos conduzem a solos caracterizados por material orgânico remanescente. Nos solos ornitogênico e solos onde alguns animais repousam, a matéria orgânica provém do excremento de aves e mamíferos marinhos. Solos com ausência de compostos húmicos tendem a ser encontrados nas partes frias e secas da Antártica, e os solos húmicos ocorrem em regiões úmidas. A complexidade das comunidades do solo e o grau de desenvolvimento do solo variam consideravelmente com a latitude, a distância da costa e a origem geológica (Treasure; Chown, 2013).

O ecossistema terrestre da Antártica é limitado a áreas sazonalmente ou permanentemente cobertas com neve e gelo, as quais apresentam diferentes formas de vida

(Convey et al., 2013). A área livre de gelo é limitada a 0,34% da área do continente, o que corresponde a aproximadamente 45.000 km<sup>2</sup>. Nestas áreas há considerável biomassa associada com neve e gelo de comunidades de micro-organismos e algas que se desenvolvem durante o verão (Stibal et al., 2012).

A Antártica apresenta um ambiente com temperaturas variáveis. A temperatura na superfície das rochas pode variar até 75°C durante o ano e pelo menos 10°C dentro de horas (Peck et al., 2006). A temperatura das piscinas naturais pode variar para mais de 50°C anualmente e até 20°C diariamente.

Para as lagoas quimicamente estratificadas, em áreas livres de gelo, a temperatura pode apresentar diferenças de até 10°C no verão entre a superfície e até 70 cm de profundidade (Hely et al., 2006).

A diversidade de espécies na Antártica é baixa, quanto considerada a riqueza de espécies distribuídas no planeta. Em níveis taxonômicos superiores muitos grupos estão completamente ausentes, e em termos funcionais, muitas funções estão mal ou não estão representado (Convey et al., 2007). A fauna consiste inteiramente de invertebrados, e é representada por duas maiores espécies de insetos (ambos Diptera), enquanto que as comunidades de plantas são predominantemente criptogâmicas, ou seja, plantas baixas como musgos, hepáticas e líquens (Smith, 2001). Apenas duas plantas superiores estão presentes no continente antártico, essas estão restritas a regiões costeiras da Península Antártica, apesar de que uma maior diversidade de plantas superiores e insetos foram identificados nas subilhas da Antártica. Para a maioria das espécies presentes na Antártica, estão faltando dados taxonômicos e existem grandes lacunas no conhecimento da sua biologia e biogeografia (Convey et al., 2007).

A Antártica possui uma das comunidades faunísticas mais simples do planeta, o que gera uma baixa complexidade dos tróficos destes ecossistemas (Hogg et al., 2006). Os ecossistemas terrestres são vulneráveis às alterações ambientais, em particular no contexto das mudanças climáticas e referente à colonização de espécies não nativas (espécies invasoras) que ocorre atualmente na Antártica (Convey, 2010).

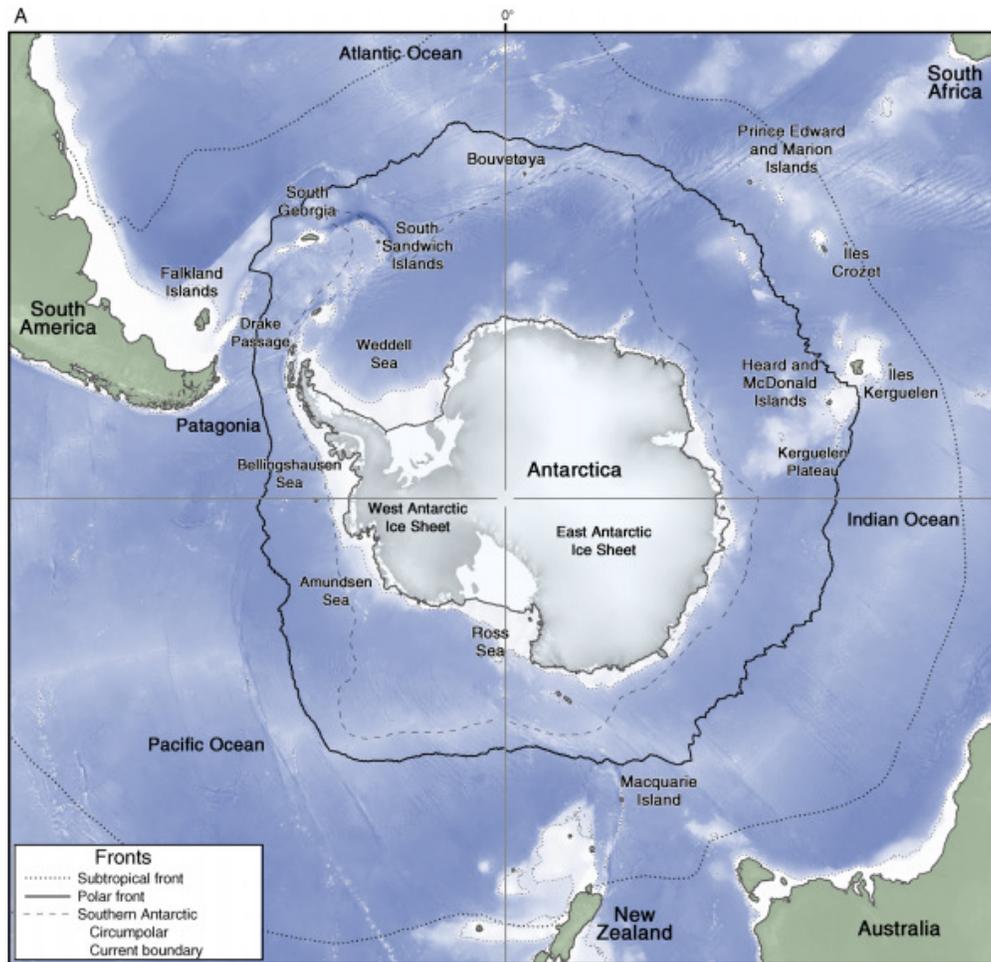


Figura 1. Mapa representativo da Antártica, com delimitação da Frente Polar Antártica (Convey et al., 2014).

Poucas informações sobre a diversidade microbiana na Antártica estão disponíveis, embora mais recentemente este panorama esteja mudando rapidamente devido a aplicação de uma abordagem de técnicas moleculares e ecofisiológicas neste ecossistema (Convey, 2010).

## 2.2. DIVERSIDADE BACTERIANA NA ANTÁRTICA

Os ambientes congelados permanentemente possuem populações microbianas diversas, viáveis e metabolicamente ativas, que possuem representantes de quase todos os grandes grupos filogenéticos. Acreditava-se que os micro-organismos polares estavam associados apenas com as partículas suspensas no ar que foram depositados na neve,

porém, é reconhecido que os micro-organismos são um componente ativo da ecologia da neve acumulada na Antártida (Michaud et al., 2014).

Lee e colaboradores (2014) isolaram 68 bactérias da Antártica e do Ártico, associados a líquen. Através da análise das sequências do gene RNA ribossomal 16S estas bactérias foram afiliadas ao Filo Actinobacteria, Bacteroidetes, Deinococcus-Thermus, e Firmicutes. Isolados pertencentes a classe *Alphaproteobacteria* foram as mais abundantes, seguidos por aqueles que pertencem as classes *Actinobacteria*, *Betaproteobacteria*, *Gammaproteobacteria*, e aos Filos Bacteroidetes, Firmicutes e *Deinococcus-Thermus*. Neste estudo, a análise filogenética mostrou que aproximadamente 21% do total de isolados representaram potenciais novas espécie ou gênero de bactérias.

Bactérias Gram-positivas, do Filo Actinobacteria e da ordem *Bacillales*, foram isoladas de esponjas coletadas do mar profundo da Antártica. As esponjas *Rossella nuda*, *Rossella racovitzae* (Porifera: *Hexactinellida*) e *Myxilla mollis*, *Homaxinella balfourensis*, *Radiella antarctica* (Porifera: *Demospongiae*), apresentaram bactérias isoladas que foram afiliadas aos gêneros *Streptomyces*, *Nocardiopsis*, *Pseudonocardia*, *Dietzia*, *Brachybacterium* e *Brevibacterium* (Filo Actinobacteria) e ao Filo Firmicutes, sendo parte desses isolados foram associados à atividade antimicrobiana (Xin et al., 2011).

Fatores como pH, matéria orgânica, e salinidade são muitas vezes as condições mais significativas de padrões de diversidade nas comunidades bacterianas do solo. Através da análise da sequência do gene RNA ribossomal 16S de bactérias obtidas de diferentes solos da Antártica, verificou-se que os solos de pH elevado contêm diversidade baixa de proporções elevadas dos Filos Acidobacteria e Actinobacteria, enquanto os solos mésicos contendo alto teor de carbono e amônio possuem altas proporções de *Nitrospira*, uma bactéria oxidante de nitrito (Geyer et al., 2014).

Nos estudos de Michaud e colaboradores (2014), a diversidade de micro-organismos associados à superfície da neve, através de identificação polifásica, apresentou abundância baixa, com cerca de  $10^3$  células.mL<sup>-1</sup> presentes no gelo. A comunidade microbiana identificada foi composta principalmente por membros da classe *Alphaproteobacterias* (gêneros *Kiloniellaceae* e *Rhodobacteraceae*), um dos grupos bacterianos mais bem representados em habitats marinhos, do Filo *Bacteroidetes* (gêneros *Cryomorphaceae* e *Flavobacteriaceae*) e de cianobactérias.

O *Permafrost*, ou Pergelissolo, é um nicho ecológico para micro-organismos adaptados ao frio. Há uma relativamente elevada diversidade microbiana no *permafrost*, embora haja alguma variação na composição da comunidade através de diferentes características de *permafrost*. Alguns micro-organismos são ativos em temperaturas abaixo de zero no *permafrost*. A análise da sequência do gene RNA ribossomal 16S revelou que o Ártico e a Antártica contêm micro-organismos de diferentes alianças funcionais, muitos dos quais são anaeróbias, incluindo acetoclásticas metanogênicas, hidrogenotróficas metanogênicas, redutores de sulfato, redutores de ferro e denitrificantes. A diversidade bacteriana em solos permanentemente congelados é geralmente mais elevada do que a diversidade de arqueias e fungos. Os Filos bacterianos comumente associados ao *permafrost* antártico incluem os Filos Proteobacteria, Bacteroidetes, Chloroflexi, Acidobacteria, Actinobacteria. Além disso, as sequências que representam uma grande diversidade de bactérias metanotróficas, por exemplo, *Methylobacterium* spp. e *Methylobacter* spp., têm sido detectadas (Jansson; Tas, 2014).

Áreas de mar aberto cercado por gelo do mar são locais de produção primária intensa e *hotspots* ecológicos no Oceano Antártico. A abundância bacteriana desse ambiente está correlacionada com a do fitoplâncton, *Phaeocystis* spp., e diatomáceas e as comunidades bacterianas nas águas superficiais são distintas daqueles sob o gelo do mar. Os gêneros *Polaribacter* e membros da família *Oceanospirillaceae* são dominantes na superfície da água enquanto o gênero *Pelagibacter* está presente em todas as profundidades (Kim et al., 2014).

### **2.3. POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DOS MICRO-ORGANISMOS DO AMBIENTE ANTÁRTICO**

Produtos naturais e seus derivados são amplamente utilizados na medicina humana para combater inúmeras doenças, incluindo infecções bacterianas, virais e fúngicas, câncer, disfunções do sistema imunológico, entre outras (Busti et al., 2006). Ao longo dos últimos 50 anos, compostos naturais produzidos por micro-organismos, especialmente do Filo Actinobacteria, tem sido amplamente usados para desenvolver a maioria das drogas antibacterianas utilizadas pela indústria farmacêutica (Ginolhac et al., 2004).

O aumento da resistência de bactérias patogênicas aos antibióticos utilizando atualmente clinicamente indica a necessidade de buscar novos compostos antimicrobianos. As adaptações que os micro-organismos da Antártida têm sido considerados, devido ao ambiente extremo que eles habitam, como uma nova fonte de potencial de compostos ativos para o controle de micro-organismos causadores de infecções associadas a cuidados de saúde (Ascencio et al., 2014).

Compostos antitumorais, antimicrobianos e antioxidantes foram obtidos dos fungos *Geomyces*, *Penicillium*, *Epicoccum*, *Pseudeurotium*, *Thelebolus*, *Cladosporium*, *Aspergillus*, *Aureobasidium*, *Phoma*, e *Trichocladium* isolados de esponjas marinhas da Antártica (Henriquez et al., 2014). Os fungos do gênero *Geomyces* foram identificados como produtores de compostos antimicrobianos e antifúngicos, os quais foram denominados Geosmina B e Geosmina C (Liu et al., 2013).

Além dos fungos, o potencial de produzir compostos antimicrobianos também foi identificado em bactérias. A bactéria *Pseudoalteromonas haloplanktis* TAC125, apresenta atividade contra a formação de biofilme de *Staphylococcus epidermidis*. Esses compostos são de importante interesse, já que os biofilmes bacterianos causam impacto na saúde humana, atividades de processamento de alimentos e na indústria (Papa et al., 2013).

O estudo de Wietz e colaboradores (2012) em ambiente extremos indicou a ocorrência e distribuição de antibióticos produzidos por bactérias cultiváveis no Oceano Ártico Central. No oceano do Ártico e da Antártica há predominância de bactérias do grupo Alphaproteobacteria, porém o potencial de biossíntese de metabólitos secundários parece ser baixo. Os grupos Gammaproteobacteria e Bacteroidetes parecem ser abundantes no gelo marinho. Tal estudo mostrou que as cepas produtoras de antibióticos estão presentes em todo o Central Oceano Ártico e ocorrer em diferentes nichos. Foram isoladas sete linhagens do gênero *Arthrobacter* sp., estreitamente relacionadas, com as sequências do gene RNA ribossomal 16S praticamente idênticas. Tais linhagens foram capazes de produzir 16 tipos de antibióticos distintos, sendo que as linhagens pertencem a habitats distantes, o que indica uma ampla especificidade nicho e ampla distribuição. Além disso, foram detectados artrobacilinas A, B e C sob diferentes condições de cultivo, em frações com e sem

antibiótico, mostrando que a atividade antimicrobiana pode ser dependente da interação de compostos diferentes (Wietz et al., 2012).

O extrato etanólico obtido do crescimento da bactéria *Janthinobacterium* sp., cepa SMN 33.6, apresentou atividade antimicrobiana contra bactérias clinicamente importante, *Acinetobacter baumannii* e *Pseudomonas aeruginosa* produtoras de carbapenemase, duas cepas de *E. coli*, duas cepas de *Klebsiella pneumoniae*, produtoras de *Extended-spectrum  $\beta$ -lactamases* (ESBL) e duas cepas de *Serratia marcescens* multirresistente (Asencio et al., 2014).

Bactérias isoladas de esponjas foram afiliados aos gêneros *Streptomyces*, *Nocardiopsis*, *Pseudonocardia*, *Dietzia*, *Brachybacterium*, *Brevibacterium* (Filo Actinobacteria) e ao Filo Firmicutes. O genoma destas bactérias foi rastreado por PCR para os genes que codificam para as sintases de policetídeo (PKS). As bactérias foram testadas para a avaliação do potencial antimicrobiano frente aos micro-organismos *Erwinia carotovora* 236, *Xanthomonas campestris* 1043, e *Xanthomonas oryzae* 1047. Oitenta e oito por cento dos isolados que possuem um gene de PKS foram ativos contra pelo menos um organismo de teste. O estudo confirma a existência de diversas bactérias em esponjas da Antártida e seu potencial para a produção de compostos ativos (Xin et al., 2011).

Bactérias marinhas isoladas da Antártica foram capazes de inibir o crescimento de bactérias multirresistentes oportunistas humanos patogênicos pertencentes ao complexo de *Burkholderia cepacia*, isolado de pacientes com Fibrose Cística através da produção de um conjunto Compostos Orgânicos Voláteis (COVs). Cerca de 30 COVs diferentes foram sintetizados em condições aeróbias por bactérias da Antártica e identificados por análise GC-SPME (Solid Phase Microextraction - Gas Chromatography). A sequência do genoma das bactérias indicou que *Pseudoalteromonas atlantica* TB41 possui os genes pertencentes ao cluster NRPS-PKS. O estudo sugere que a atividade antimicrobiana exibida por bactérias da Antártica pode depender de um complexo de COVs, e sugere que a biossíntese destes compostos pode ocorrer através de vias metabólicas ainda desconhecidas (Papaleo et al., 2013).

A produção de enzimas lipase e protease foram associadas às bactérias que foram isoladas de amostras de líquens de diferentes regiões da Antártica. A atividade de proteases extracelulares foi detectada em seis isolados, filiados aos gêneros *Burkholderia*,

*Frondehabitans*, *Hymenobacter*, *Pseudomonas*, e *Rhodanobacter*. Por outro lado a atividade da enzima lipase foi detectada em isolados pertencentes aos gêneros *Burkholderia*, *Deinococcus*, *Frondehabitans*, *Pseudomonas*, *Rhodanobacter*, *Sphingomonas* e *Subtercola* (Lee et al., 2014).

Gratia e colaboradores (2009) avaliaram a produção enzimática a 4 ° C por bactérias isoladas da Antártica. Os resultados obtidos no estudo evidenciaram que isolados de bactérias pertencentes aos gêneros *Psychrobacter* sp. e *Arthrobacter* sp. tiveram a maior atividade da lipase, o isolado *Arthrobacter* sp. C12 apresentou alta atividade da enzima amilase, outro isolado identificado como *Pseudomonas* sp. possuiu a maior atividade de caseinase, e diferentes isolados de *Pseudomonas* sp. apresentaram alta atividade de gelatinase.

A produção de biossurfactantes foi identificada pela bactéria *Oceanobacillus* sp. BRI 10 isolado da água do mar. Este biossurfactante, uma glicolipoproteína, pode ser aplicada contra poluição por diversos tipos de hidrocarbonetos, já que foi capaz de emulsionar o óleo lubrificante, óleo cru, diesel e querosene. Neste estudo, o experimento de biodegradação do petróleo bruto resultou em 90% de degradação após 27 dias de aplicação do biossurfactante (Jadhav et al., 2013).

Muitos organismos vivos nativos do Ártico e da Antártica expressam proteínas anticongelantes (AFPs) ou glicoproteínas anticongelantes (AFGPs) que reconhecem e se ligam a locais específicos de cristais de gelo, inibindo assim o crescimento do gelo. A depressão do ponto de congelamento induzida por estas proteínas resulta principalmente das suas estruturas químicas únicas, que podem estar presentes em plantas, insetos e bactérias (Haridas et al., 2013). As proteínas anticongelantes, ao inibir o crescimento do gelo permitem a sobrevivência dos organismos polares em ambientes extremamente frios. A proteína FfIBP é uma proteína anticongelante codificada pela bactéria da Antártica *Flavobacterium frigoris* PS1. Essa proteína se diferencia de outras quanto à composição de aminoácidos do local de ligação de gelo, que se correlaciona com as diferenças na afinidade e complementaridade para a superfície de cristais de gelo. Acredita-se que essa proteína apresente um potencial biotecnológico, já que pode ser implementada em criopreservação e

criocirurgia, além de ser utilizada como novos agentes anticongelantes, produto de alto interesse para a indústria alimentícia (Do et al., 2014).

Em climas temperados, as baixas temperaturas durante as estações frias podem afetar negativamente a atividade metabólica dos micro-organismos nativos, o que conduz a uma taxa de biotransformação fraca de poluentes e a sua acumulação no caso de uma entrada contínua. A utilização de micro-organismos psicrófilos poderia fornecer uma alternativa útil já que os micro-organismos psicrófilos são adaptado para ambas as temperaturas, baixas e moderadas (Margesin et al., 2002). Dessa forma, o uso de micro-organismos psicrófilos para processos biológicos em baixa temperatura pode apresentar maior produtividade e eficácia, quando comparado aos processos realizados por micro-organismos mesófilos em processos de baixa temperatura.

#### **2.4.POLICETÍDEOS SINTASES E PEPTÍDEOS SINTASES NÃO RIBOSSOMAL**

Os produtos de policetídeos naturais são uma classe notável de compostos. Além de exibir uma gama surpreendente de diversidade estrutural e funcional, eles possuem uma riqueza de atividades medicinalmente importantes, incluindo antibióticos, anticancerígeno, antifúngicos, antiparasitários e propriedades imunossupressoras (Figura 2). Mesmo antes de conhecer toda a diversidade funcional dos policetídeos, os cientistas ficaram interessados em saber como essas moléculas complexas eram produzidas (Staunton e Weissman, 2001).

Os Policetídeos Sintases (PKS) catalisam a biossíntese de policetídeos e podem contribuir para a produção natural de antibióticos e colocam pressão seletiva para o desenvolvimento de bactérias resistentes aos antibióticos no meio ambiente. Técnicas de PCR convencional foram desenvolvidas para detectar a presença de genes de PKS (Le et al., 2014).

A diversidade de policetídeos deriva de várias formas de construção e de dobragem das cadeias de carbono, que são montadas em produtos naturais por meio de uma série de reações. Os policetídeos são catalisados pelas enzimas policetídeo sintases. O PKS tipo I é uma proteína multifuncional modular que catalisa a biossíntese de antibióticos macrolídeos, como a eritromicina e tilosina, e que contém muitos sítios ativos diferentes, sendo cada sítio necessário para um passo de catálise enzimática na montagem da cadeia de carbono e via

de modificação (Staunton e Weissman, 2001; Zucko et al., 2007). O PKS tipo II é uma proteína monofuncional que catalisa a biossíntese de policetídeos aromáticos, tais como ácido-6-metilsalicílico e actinorodina, e ele contém um único conjunto de sítios ativos interativos que realizam a reação repetidamente para construir a espinha dorsal de toda a cadeia de carbono (Staunton e Weissman, 2001). Uma vez que a biossíntese de muitos antibióticos é catalisada por PKS, a quantificação dos tipos de genes PKS, tipo I e II, pode ser utilizados para avaliar a probabilidade de produção de antibiótico natural a partir de amostras ambientais (Le et al., 2014).

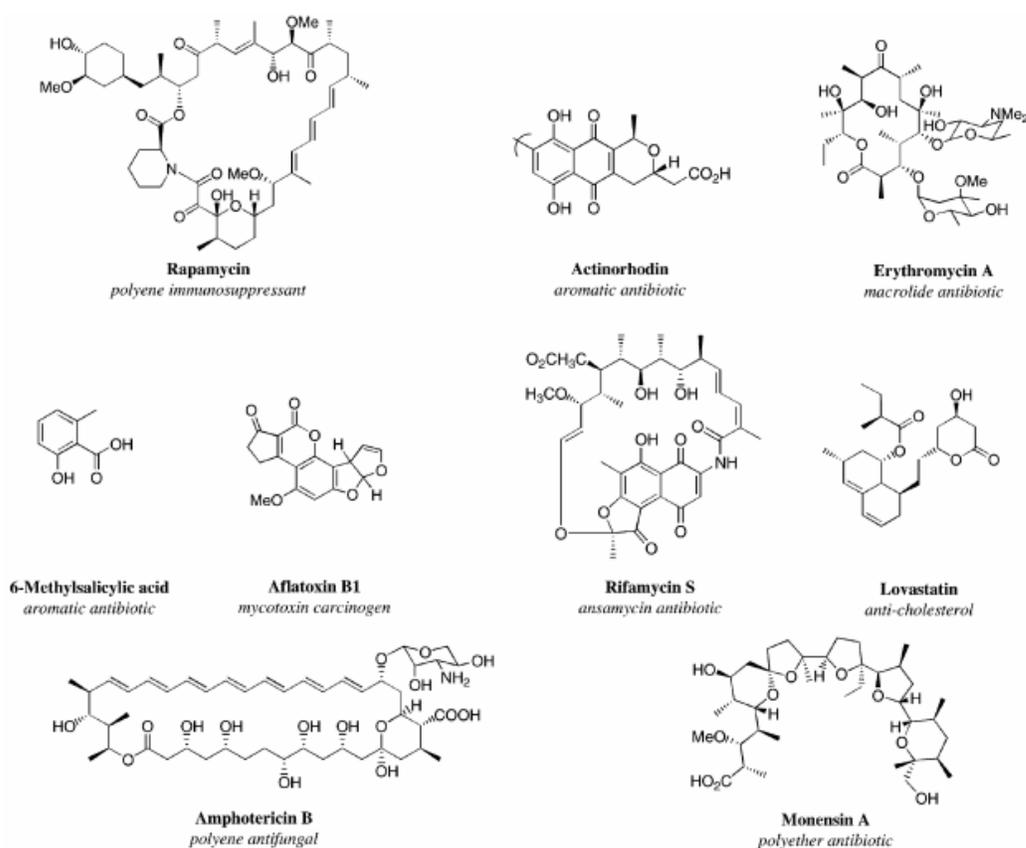


Figura 2. Exemplos de policetídeos oriundos de metabólitos secundários. O nome do policetídeo e a sua atividade biológica estão indicadas (Staunton e Weissman, 2001).

Os *clusters* dos genes PKS que codificam para os metabólitos secundários ainda desconhecidos foram descobertos em um elevado número de cromossomos bacterianos, enquanto outros foram localizados através da clonagem de genes que não foram

originalmente o alvo. Sem exceção, cada PKS tem a organização modular de 6-deoxieritronolida B sintase (DEBS) em que cada módulo catalisa um único ciclo de condensação e redução (Staunton e Weissman, 2001).

Cada módulo de PKS-I codifica pelo menos três domínios correspondentes a um cetosintase (KS), aciltransferase (AT), e proteína acil-transportadora (ACP) envolvidos na seleção e condensação da correta unidade de extensão. Os domínios também podem incluir adicional enoilredutase, desidratase, e cetorredutase. Todos estes domínios estão envolvidos na síntese programada de uma nova cadeia de policetídeo (Ayuso-Sacido; Genilloud, 2005).

Uma classe de produtos naturais produzidos, os peptídeos sintase não-ribossomais (NRPS) são de extraordinária importância farmacológica. A esfera de atividade destes peptídeos, que são em sua maioria de origem bacteriana ou fúngica, alcança desde antibióticos a imunossupressores. Devido a sua enorme importância para a medicina moderna, a investigação de sua biossíntese é de grande interesse, uma vez que possibilidades para uma manipulação dirigida permitiria a geração de novas drogas (Schwarzer et al., 2003).

Entre os NRPSs, existem antibióticos importantes como a vancomicina, daptomicina, e os antibióticos beta-lactâmicos o que enfatiza a importância dos NRPSs na indústria. Eles também atraem interesse para fins biotecnológicos porque a biossíntese combinatória de genes NRPS pode ser aplicada para a produção de novos policetídeos não-ribossomais (Walsh, 2004).

Os NRPSs apresentam estrutura modular, e cada módulo é responsável pela condensação de um aminoácido. Um módulo é normalmente composto por três domínios, domínio de condensação, adenilação e de tiolação (Muliandi et al., 2014).

Os peptídeos não-ribossomais (NRP) não seguem o dogma central de que o DNA produz o RNA que produz a proteína. Em vez disso, eles são montados por peptídeos sintases não-ribossomais (NRPSs) que representam tanto o modelo livre de mRNA e livre da maquinaria para biossíntese de peptídeos. Assim, NRP não estão diretamente inscritos nos genomas e não pode ser inferida com sequenciamento de DNA tradicional. Em vez disso, eles são codificados por NRPSs usando "código não-ribossomal" (também chamado de regra Stachelhaus) descoberto há 15 anos (Mohimani et al., 2014).

Tradicionalmente, a seleção de grupos microbianos de interesse biotecnológico havia sido realizada através de características morfológicas e critérios taxonômicos. No entanto, uma avaliação precoce para a produção de metabólitos secundários destes diferentes grupos taxonômicos permitiria concentrar a triagem no grupos metabolicamente mais promissores. A detecção de sequências de genes envolvidos na síntese de metabólitos secundários para avaliar o potencial biossintético pode representar uma forma alternativa de se rastrear não apenas em grupos microbianos de interesse taxonômico, mas também nos isolados com maior potencial metabólico (Ayuso-Sacido; Genilloud, 2005)

## 3. OBJETIVOS

---

### 3.1. OBJETIVO GERAL

Este estudo tem como objetivo principal a prospecção genética e funcional do da produção de compostos antimicrobianos por bactérias isoladas da Antártica, além da caracterização taxonômica da diversidade e caracterização do perfil químico dos extratos brutos obtidos por ela.

### 3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Selecionar os isolados de bactérias oriundas da Antártica com potencial farmacológico para a produção de compostos antimicrobianos;
- Avaliar qualitativa- e quantitativamente a atividade antimicrobiana dos extratos brutos das bactérias frente a micro-organismos indicadores não virulentos e virulentos provenientes de amostras clínicas;
- Caracterizar quimicamente os extratos brutos com atividade antimicrobiana.

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

---

### 4.1. ISOLAMENTO, PRESERVAÇÃO E REATIVAÇÃO DOS ISOLADOS

Os micro-organismos avaliados no presente estudo foram isolados a partir de organismos marinhos de diferentes espécies e do sedimento. Foram coletadas na Estação Brasileira Comandante Ferraz, Antártica, uma esponja, duas ascídias, duas salpas, seis algas, um osso de baleia, um líquen, uma pedra com líquens, um ouriço do mar e sedimento marinho, em quatro pontos distintos, que foram mantidas em sacos esterilizados com gelo por sete dias. A coleta foi realizada por Msc. Fernando S. Nobre (CPQBA/UNICAMP), Prof. Dr. Eduardo Hadju (UFRJ) e pela equipe da Profa. Dra. Vivian H. Pellizari (IO/USP) em diferentes pontos de coleta durante expedição a Antártica pelo Programa Antártico Brasileiro no verão de 2010.

O isolamento foi realizado na Divisão de Recursos Microbianos (CPQBA/UNICAMP) e os isolados foram mantidos no acervo de pesquisa da divisão. Para isolar as bactérias do ambiente antártico, estes foram triturados em homogenizador (Ultra-Turrax, IKA T18 Basic). Do extrato e do sedimento foram realizadas diluições, sendo que as diluições  $10^{-2}$  e  $10^{-4}$  foram semeadas em três diferentes meios de cultivo, M1 (Mincer et al., 2002), Yeast malt-extract medium (ISP2) (4 g extrato de levedura; 10 g extrato de malte; 4 g de glicose; 20 g de ágar; para 1000 mL e pH 7,3) e Nutrient Agar (NA Difco) preparados com água do mar artificial (ASW) (KBr  $0,1\text{g.L}^{-1}$ , NaCl  $23,48\text{ g.L}^{-1}$ ,  $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$   $10,61\text{ g.L}^{-1}$ ,  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$   $1,47\text{ g.L}^{-1}$ , KCl  $0,66\text{ g.L}^{-1}$ ,  $\text{SrCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$   $0,04\text{ g.L}^{-1}$ ,  $\text{Na}_2\text{SO}_4$   $3,92\text{ g.L}^{-1}$ ,  $\text{NaHCO}_3$   $0,19\text{ g.L}^{-1}$ ,  $\text{H}_3\text{BO}_3$   $0,03\text{ g.L}^{-1}$ ). As placas foram incubadas a  $28^\circ\text{C}$  e  $14^\circ\text{C}$  e o surgimento de colônias observado diariamente até se esgotar a possibilidade de isolamento de bactérias. Após o período de incubação, os isolados foram selecionados com base em características morfológicas das células e preservados pelo método de ultracongelamento a  $-80^\circ\text{C}$  (Hunter-Cevera; Belt, 1996; Kirsop; Doyle, 1991).

### 4.2. CARACTERIZAÇÃO DOS ISOLADOS POR TAXONOMIA CLÁSSICA

As bactérias foram reativadas nos respectivos meios de cultivo utilizados no isolamento, preparados com solução de água do mar artificial (ASW). A avaliação das características morfológicas foi realizada através de microscopia ótica para a confirmação de colônias puras. Nos casos de confirmação de contaminação, houve um novo isolamento para obtenção de colônias puras, e confirmação através de microscopia ótica, onde foram observadas características como a forma da célula e coloração de Gram. Os novos isolados foram preservados pelo método de ultracongelamento a  $-80^{\circ}\text{C}$ .

### **4.3. DETECÇÃO DE GENES ASSOCIADOS AOS SISTEMAS PKS-I, PKS-II E NRPS**

A detecção do potencial biotecnológico das bactérias oriundas da Antártica baseou-se na amplificação dos genes *PKS I*, *PKS II* e *NRPS* com *primers* degenerados descritos na literatura (Metsa Ketela et al., 1999; Ayuso-Sacido; Genilloud, 2005), após a extração do DNA genômico.

#### **4.3.1. EXTRAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DO DNA GENÔMICO**

Os isolados preservados foram reativados em 5 mL de meio Nutrient Broth (Difco ref. 234000) e incubados a  $28^{\circ}\text{C}$  por 24 a 72 h. Após o crescimento bacteriano as células foram recuperadas por centrifugação a 12.000 rpm por 2 min. e a extração do DNA genômico foi realizada segundo o método descrito por Van Soolinger *et al.* (1991).

As células foram recuperadas em 1 mL de tampão SET (NaCl 75 mM, EDTA 25 mM, Tris 20 mM em pH 7,5) e centrifugadas a 12.000 rpm por 5 min., o sobrenadante foi descartado e o precipitado foi ressuscitado, novamente, em 0,5 ml do mesmo tampão. Foram adicionados 5  $\mu\text{L}$  de solução de lisozima numa concentração final de  $1\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  e, em seguida, os tubos foram incubados a  $37^{\circ}\text{C}$  por 60 min. Posteriormente, foram adicionados 1/10 de volume de dodecil sulfato de sódio (SDS) a 10% e  $0,5\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  de proteinase K (solução estoque  $10\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ), e os tubos foram incubados a  $55^{\circ}\text{C}$  por 2 h, tendo sido realizadas inversões ocasionais durante esse período. Foram adicionados 1/3 do

volume de NaCl 5 M e um volume de clorofórmio, em seguida, os tubos foram incubados a temperatura ambiente por 30 min., tendo sido misturados por inversões ocasionais. Os tubos foram, então, centrifugados a 12.000 rpm por 10 min. e a fase aquosa foi transferida para um novo tubo de polipropileno. O DNA foi precipitado com um volume de isopropanol e os tubos foram invertidos várias vezes a fim de misturar as soluções ou até visualizar um precipitado fibroso branco. Os tubos foram centrifugados a 6.500 rpm por 3 min.

O DNA precipitado foi lavado duas vezes com 1,0 mL de etanol 70% (v/v) e, em seguida os tubos foram centrifugados a 6.500 rpm por 3 min. entre as lavagens. O DNA precipitado foi mantido a temperatura ambiente ou em estufa a 37°C até secar completamente. Em seguida, o DNA foi dissolvido em 200 µL de TE pH 8,0 (10mM de Tris-HCl 1M pH 8,0 e 1mM de EDTA 0,5M pH 8,0) e 10 µL de RNase (10 mg/mL) foram adicionados a suspensão. Os tubos foram incubados por 1 hora a 37 °C. Após este período, foram adicionados 20 µL de cloreto de lítio 4 M e um volume de clorofórmio-álcool isoamílico (24:1), a fim de remover as proteínas da suspensão. Os tubos foram agitados manualmente e centrifugados a 12.000 rpm por 10 min. A amostra foi precipitada com dois volumes de etanol absoluto gelado e os tubos foram centrifugados a 6.500 rpm por 3 min. O sobrenadante foi descartado. O DNA precipitado foi lavado duas vezes com etanol 70% conforme descrito anteriormente. O DNA precipitado foi seco nas mesmas condições já mencionadas e, em seguida, foi ressuscitado em 20 a 50 µl de água Milli-Q e estocados a 4 °C.

O DNA extraído foi quantificado através da comparação do DNA λ em diferentes concentrações em gel de agarose a 0,8% submetido à eletroforese por 30 min. em condição de 5 V/cm. Após sua quantificação, o DNA extraído foi armazenado em tubos de polipropileno e mantido a temperatura de 4 °C.

#### **4.3.2. TRIAGEM GÊNICA POR PCR**

A seleção de bactérias com potencial biotecnológico foi feita através da amplificação dos genes *PKS-I*, *PKS-II* e *NRPS*. A amplificação do sistema *PKS-I* foi obtida com o

conjunto de *primers* K1 (5'-TSAAGTCSAACATCGGBCA-3') e M6R (5'-CGCAGGTTSCSGTACCAGTA-3') (Ayuso-Sacido; Genilloud, 2005). O sistema PKS-II foi amplificado com o par de *primers* PKSII\_JF (5'-TSGCSTGCTTCGAYGCSATC-3') e PKSII\_JR (5'-TGGAANCCGCCGAABCCGCT-3') conforme descrito por Metsa Ketela et al. (1999). A amplificação do sistema NRPS foi obtida com o conjunto de *primers* A3 (5'-GCSTACSYSATSTACACSTCSGG-3') e A7R (5'-SASGTCVCCSGTSCGGTAS-3') (Ayuso-Sacido; Genilloud, 2005).

Reações de PCR para amplificação dos genes *PKS-I*, *PKS-II* e *NRPS* foram feitas usando 0,5 µM de cada *primer* específico, 1,0 mM tampão 10X, 0,2 µM dNTP's, 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 2,5 U de Taq Polimerase (Invitrogen) e 50 ng de DNA, em um volume final de 25 µL de reação. As condições das reações foram: 5 min. a 95 °C e 35 ciclos de 1 min. a 95°C, 2 min. a 55 °C e 2 min. a 72 °C, seguido por extensão final de 10 min. a 72 °C (Ayuso-Sacido; Genilloud, 2005), em termociclador da marca *Eppendorf*. Os produtos obtidos foram analisados e visualizados em gel de agarose 1,2 % submetidos à eletroforese por 60 min. em condição de 5 V/cm.

#### **4.4. CARACTERIZAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DOS ISOLADOS**

Dentre 153 isolados obtidos foram selecionados 127 bactérias com potencial biotecnológico, a partir da triagem gênica dos genes *PKS* e *NRPS*. Visando reduzir o número de isolados para a produção de extratos brutos, foi realizada a identificação do gênero de cada isolado através da análise parcial da sequência do gene RNA ribossomal 16S, dessa forma, um representante distinto de cada gênero foi selecionado.

##### **4.4.1. AMPLIFICAÇÃO DO GENE RNA RIBOSSOMAL 16S DE BACTÉRIAS**

A amplificação do gene RNA ribossomal 16S foi feita por meio de uma reação de polimerase em cadeia (PCR) com os *primers* 10f (5' AGTTTGATCCTGGCTCAG 3') e 1525r (5' AGG GTT GGG GTG GTT G 3') (Lane et al., 1991), homólogos às regiões conservadas do gene RNA ribossomal 16S de bactérias utilizando com molde o DNA genômico obtido pelo protocolo descrito anteriormente.

As seguintes condições foram utilizadas na reação de amplificação: 0,4  $\mu$ M de cada *primer* específico, 1 mM tampão 10X, 0,2  $\mu$ M dNTP's, 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 2,5 U de Taq Polimerase (Invitrogen) e 50 ng de DNA, em um volume final de 25  $\mu$ L de reação. Para a amplificação foi realizada uma desnaturação inicial de 95 °C por 2 min., seguida de 30 ciclos sendo: 94 °C por 1 min., 55 °C por 1 min., 72 °C por 3 min., extensão final de 3 min. a 72°C, em termociclador *Eppendorf*. O tamanho dos produtos de PCR foi confirmado através de eletroforese em gel de agarose 1,2%.

#### 4.4.2. SEQUENCIAMENTO E ANÁLISE DE GENE RNA RIBOSSOMAL 16S

Para o sequenciamento automatizado, os produtos de PCR foram purificados utilizando-se mini-colunas (*GFX PCR DNA e gel band purification kit*, GE Health Care) e submetidos ao sequenciamento em sequenciador automático ABI3500XL Series (Applied Biosystems). As reações de sequenciamento foram realizadas com o kit *BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit* (Applied Biosystems Life Technologies). Para a reação de sequenciamento foi utilizado apenas um *primer*, o 10f, para obtenção das sequências. A sequência obtida foi submetida a comparação na base de dados Genbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) e no Eztaxon-e (<http://eztaxon-e.ezbiocloud.net/>), sendo dessa forma obtido o gênero ao qual cada isolado pertence.

Finalmente, os isolados com atividade antimicrobiana frente os micro-organismos avaliados foram identificados por taxonomia molecular baseada na análise filogenética da sequência completa do gene RNA ribossomal.

As sequências obtidas no sequenciamento com os primers 10f (5'-GAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'), 765f (5'-ATTAGATACCCTGGTAG-3'), 782r (5'-ACCAGGGTATCTAATCCTGT-3'), 1100r (5'-AGGGTTGCGCTCGTTG-3') e 1525r (5'-AGGGTTGGGGTGGTTG-3') foram, então, processadas no programa phred/Phrap/CONSED versão Linux (Ewing et al., 1998; Godon et al., 1997) para a montagem dos *contigs*. A sequência com aproximadamente 1200 pb foi submetida à comparação nos bancos de dados, Genbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>), no Eztaxon-e (<http://eztaxon-e.ezbiocloud.net/>) e Ribosomal Data Project II 9.0 (<http://rdp.cme.msu.edu/index.jsp>). As sequências recuperadas dos bancos de dados foram

alinhas no programa CLUSTAL X (Thompson et al., 1997), editadas no BIOEDIT (Hall, 1999) e as análises filogenéticas conduzidas utilizando o programa MEGA versão 6 (Tamura et al., 2013). A matriz de distância evolutiva foi calculada com o modelo de Kimura (Kimura, 1980) e a construção da árvore filogenética a partir das distâncias evolutivas foi feita pelo método de Neighbor-Joining (Saitou e Nei, 1987), com valores de *bootstrap* calculados a partir de 1.000 repetições (Felsenstein, 1985).

#### **4.5. AVALIAÇÃO QUALITATIVA DA PRODUÇÃO DE ANTIMICROBIANOS PARA ISOLADOS DE MESMO GÊNERO**

A avaliação qualitativa da produção de antimicrobianos foi realizada através do método do bloco de gelose. Este método permitiu reduzir o número de extratos brutos a serem produzidos de representantes de gêneros com maior número de isolados. Dentre os 127 isolados selecionados através da triagem dos genes que indicam potencial farmacológico, 76 isolados correspondem a oito gêneros. Os resultados qualitativos de atividade antimicrobiana foram utilizados para selecionar quais bactérias, dentre os 76 isolados, seriam utilizados para produção de extratos brutos e da avaliação quantitativa da atividade antimicrobiana pelo método de microdiluição.

##### **4.5.1. MÉTODO DO BLOCO DE GELOSE**

A metodologia descrita por Ichikawa e colaboradores (1971), conhecida como “Método do bloco de gelose” consiste na propriedade da difusão do composto bioativo pelo meio sólido e na observação da formação de halos pela sobreposição do bloco contendo colônias de bactérias produtoras sobre colônias de bactérias indicadoras.

A atividade antimicrobiana foi testada contra as bactérias indicadoras *Bacillus subtilis* ATCC 6051, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 13388, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Escherichia coli* ATCC 11775, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228, *Salmonella choleraesuis* ATCC 10708, *Micrococcus luteus* ATCC 4698, *Candida albicans* ATCC10231.

Inicialmente, os isolados foram reativados conforme descrito anteriormente e repicados em seus respectivos meios de isolamento com o auxílio de uma alça de Drigalski. As placas foram levadas à estufa e mantidas a 28°C e 14°C, temperatura a qual foi isolado, por 24 horas. Após reativação, as bactérias indicadoras contidas no meio Muller-Hinton Broth para bactérias e Sabouraud Dextrose para a levedura, foram padronizadas na concentração aproximada de  $1,5 \times 10^8$  UFC.mL<sup>-1</sup>, de acordo com a escala de McFarland. Em sequência foram semeadas com alça de Drigalski no meio Mueller-Hinton Agar para bactérias e meio Sabouraud Dextrose Agar para a levedura. Em seguida, blocos de ágar circulares de 6 mm foram retirados das placas contendo as colônias de bactérias produtoras e transferidos para as placas com os micro-organismos indicadores semeados. O teste foi realizado em triplicata para todas as bactérias isoladas, organizadas em duas amostras diferentes por placa.

As placas foram incubadas a 28 ° C e as leituras foram feitas após 24 h e após 96 h, sendo que a medida do halo foi realizada na segunda leitura. Com o valor obtido, em mm, foi calculada uma média e desvio padrão e os resultados foram analisados pela escala sugerida por Matsuura (2004) (Tabela 1). O controle do meio de cultivo foi realizado inoculando-se somente blocos de ágar do meio de cultivo NA (*Nutrient Agar*, Oxoid) (sem os micro-organismos isolados) sobre os micro-organismos teste.

Tabela 1. Escala de classificação de halos de inibição sugerida por Matsuura (2004)

<b>Tipo de inibição</b>	<b>Tamanho do halo de inibição</b>
Ausente	0
Baixa	7,0-10,0 mm
Moderada	11,0-14,0 mm
Alta	> 14,0 mm

#### **4.6. OBTENÇÃO DOS EXTRATOS BRUTOS**

O processo de obtenção dos extratos brutos foi realizado na Divisão de Química de Produtos Naturais, CPQBA/UNICAMP, com colaboração do Dr. Rodney Alexandre Ferreira Rodrigues.

Derivados do metabolismo dos isolados bacterianos, os extratos foram obtidos pelo método de separação líquido-líquido, utilizando o solvente acetato de etila na extração. Um pré-inóculo das bactérias foi feito em 7 mL de meio Nutrient Broth (Difco ref. 234000) com água do mar artificial e incubado a 30 °C por 24 a 48 h. Após o crescimento da cultura, o volume total foi transferido para um Erlenmeyer contendo 50 mL do mesmo meio de cultura e mantidos na mesma temperatura e tempo. Novamente, 50 mL do crescimento bacteriano foram transferidos para um frasco de vidro contendo 500 mL do mesmo meio e mantido sob as mesmas condições de temperatura, sem agitação, por quatro semanas.

Após esse período, 500 mL de acetato de etila foram adicionados ao meio contendo o crescimento bacteriano e triturados no ultra-turrax a 7.000 rpm durante 6 min. A mistura foi mantida *overnight* para favorecer a divisão das duas fases formadas. Os extratos brutos foram obtidos pelo método de separação líquido-líquido em funil de separação. Após a separação das fases orgânicas e aquosas, a fase orgânica foi transferida para um balão de fundo redondo de 1 L. Foram adicionados mais 150 mL de acetato de etila à fase aquosa e, novamente triturada no ultra-turrax nas mesmas condições. Novamente, as fases foram separadas, sendo a fase orgânica transferida para o mesmo balão de fundo redondo e o procedimento foi repetido por mais uma vez para a fase aquosa. Os extratos brutos foram concentrados em rotaevaporador (Rotavapor R-215 Buchi), a vácuo e temperatura de 30°C, até completa secagem do solvente. Para a divisão do extrato bruto, foi adicionado o solvente e dividido em três frascos de vidro, os quais foram concentrados em rotaevaporador, sob as mesmas condições. Os extratos brutos foram encaminhados para ensaios de atividade antimicrobiana e para análise por cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massas.

#### **4.7. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA CONTRA MICRO-ORGANISMOS NÃO VIRULENTOS**

A avaliação da atividade antimicrobiana de micro-organismos não patogênicos foi realizada em colaboração com a Dra. Marta Cristina Teixeira Duarte na Divisão de Microbiologia, CPQBA/UNICAMP, conforme método de Microdiluição (CLSI, 2002; CLSI, 2003) estabelecido na Divisão.

A atividade antimicrobiana dos extratos brutos obtidos dos isolados de micro-organismos foi avaliada frente aos seguintes micro-organismos: *Bacillus subtilis* ATCC 6051, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 13388, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Escherichia coli* ATCC 11775, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228, *Salmonella choleraesuis* ATCC 10708, *Micrococcus luteus* ATCC 4698, *Candida albicans* ATCC 10231. Os micro-organismos foram preservados em meios de cultura específicos, meio Mueller-Hinton para bactérias e meio RPMI-1640 para a levedura *C. albicans*, repicados 24h antes dos ensaios de atividade antimicrobiana e mantidos em estufa a 36°C para crescimento.

#### **4.7.1. TRIAGEM *IN VITRO* DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DOS EXTRATOS DOS MICRO-ORGANISMOS PELO MÉTODO DA MICRODILUIÇÃO**

Para uso nos testes de atividade antimicrobiana, os extratos foram solubilizados em solução de Tween 80 em água (0,1 %), ou em DMSO a 5% no meio de cultivo indicado. A concentração máxima testada foi de 2,0 mg.mL<sup>-1</sup>.

#### **4.7.2. PREPARO DE INÓCULOS PADRONIZADOS**

Os inóculos dos diferentes micro-organismos alvo foram preparados a partir de suspensão de células de crescimento recente (24 h) em solução salina, sendo a densidade ótica acertada em espectrofotômetro até turbidez correspondente a solução de Mc Farland 0,5 a 625 nm (Absorbância entre 0,08 e 0,1), seguido da diluição indicada para cada tipo de micro-organismo, no meio de cultura.

#### **4.7.3. DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO MÍNIMA INIBITÓRIA (MIC) E CONCENTRAÇÃO BACTERICIDA MÍNIMA (MBC) PELO MÉTODO DA MICRODILUIÇÃO**

Em uma microplaca esterilizada de 96 poços foram depositados 100 µL dos meios de cultura Mueller-Hinton para bactérias e meio RPMI-1640 para a levedura, sendo a coluna 12 utilizada para os controles do micro-organismo e de esterilidade do meio de cultura. Na coluna 1 - linha A, foram acrescentados 50µL da solução do extrato a ser testado, de concentração conhecida (uma substância diferente para cada coluna), sendo estes referentes ao controle de esterilidade das amostras. Em seguida, 100µL dos mesmos extratos foram adicionados na linha B, o conteúdo dos orifícios foi homogeneizado com o meio e o volume transferido para o orifício da linha seguinte (C), repetindo-se este procedimento até a linha H, de modo a obter uma concentração decrescente do material. Os 100µL finais foram desprezados. Em seguida foram adicionados 100µL do inóculo do micro-organismo avaliado, cuja turvação foi comparada à escala McFarland 0,5, seguido de diluição para concentração final de  $10^4$  células.mL<sup>-1</sup> (bactérias), no meio indicado. As placas foram seladas com as tampas plásticas e parafilm® e incubadas por 24h à 36°C. Após este período as placas foram avaliadas e a MIC definida como a menor concentração do material capaz de impedir o crescimento dos micro-organismos.

A Concentração Bactericida Mínima (MBC) foi determinada ao avaliar o crescimento dos micro-organismos indicadores em meio de cultivo sólido, Mueller-Hinton Ágar para bactérias e meio Sabourad Dextrose Ágar para *C. albicans*. Após ser obtido o resultado da MIC, um conteúdo de cada poço foi coletado com alça de platina e paqueado no meio de cultivo específico. Após 24 a 36 h, era avaliado o crescimento dos micro-organismos para cada poço. O resultado foi obtido após verificar uma concentração mínima do extrato bruto do qual não foi observado o crescimento de micro-organismos.

Foram inseridos três controles no teste, sendo: o (1) controle negativo, que possui o meio de cultivo Muller-Hinton sem o crescimento de micro-organismos, (2) o controle positivo que possui o inóculo de micro-organismo sem extrato, (3) o meio de cultivo com o controle “Branco” que possui o extrato considerado “Branco”.

#### **4.7.4. LEITURA DOS RESULTADOS**

Bactérias: Após o período de incubação de 24h foram adicionados 50 mL da solução de TTC (cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólico) e as placas foram re-incubadas por 3 h. A MIC

foi definida como a menor concentração da amostra, capaz de impedir o aparecimento de coloração vermelha, conferida ao meio quando as células bacterianas apresentam atividade respiratória. Os resultados foram lidos no início e final de cada ensaio, em leitora de Elisa (ASYS) para confirmação da presença ou ausência de crescimento microbiano.

Levedura: Após o período de incubação de 36 h foi verificado se houve mudança de coloração do meio RPMI-1640, de rosa (cor original) para amarelo, o que indica mudança de pH ocasionada pelo crescimento microbiano.

#### **4.8. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA CONTRA MICRO-ORGANISMOS VIRULENTOS PROVENIENTES DE AMOSTRAS CLÍNICAS**

A avaliação da atividade antimicrobiana de micro-organismos não patogênicos possibilitou resultados de extratos brutos promissores para uma possível obtenção de novos compostos antimicrobianos. Dessa forma, foram utilizados os extratos que apresentaram resultado positivo na avaliação do MIC, para realização do teste de microdiluição com micro-organismos virulentos oriundos de amostras clínicas. O experimento foi realizado em colaboração com o Dr. Marcelo Lancellotti no Laboratório de Biotecnologia, IB/UNICAMP, conforme método de Disco-difusão em Ágar (CLSI, 2012) e Microdiluição descrito anteriormente.

##### **4.8.1. TRIAGEM QUALITATIVA DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA**

A atividade antimicrobiana dos extratos em estudo foi avaliada frente aos seguintes micro-organismos de origem clínica e patogênicos, presentes na coleção de micro-organismos do Laboratório de Biotecnologia: *Streptococcus pyogenes* KPJF3, *Streptococcus pyogenes* K48, *Pseudomonas aeruginosa* 31 NM, *Pseudomonas aeruginosa* PA 765F, *Pseudomonas aeruginosa* PA ATCC, *Pseudomonas aeruginosa* PA 37F, *Staphylococcus aureus* BEC, *Staphylococcus aureus* Rib 1, *Escherichia coli* EC 530, *Escherichia coli* DT, *Escherichia coli* 342, *Haemophilus influenzae* Rd, *Streptococcus pneumoniae* Pn 360, *Streptococcus pneumoniae* Pn 3, *Streptococcus pneumoniae* Pn Hc,

*Neisseria meningitidis* W ATCC, *Neisseria meningitidis* Y USA, *Neisseria meningitidis* C 2135, *Neisseria meningitidis* B4.

Os micro-organismos foram reativados em meios de cultura específicos, meio Mueller-Hinton para *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Neisseria meningitidis*, meio Ágar Sangue para *Streptococcus pyogenes* e *Streptococcus pneumoniae*, meio Ágar Chocolate para *Haemophilus influenzae*, todos repicados 24h antes dos ensaios de atividade antimicrobiana e mantidos em estufa a 36°C para crescimento.

#### **4.8.1.1. MÉTODO DE DISCO-DIFUSÃO EM ÁGAR**

Após reativação, as bactérias indicadoras contidas no meio caldo foram padronizadas na concentração aproximada de  $1,5 \times 10^8$  UFC.mL<sup>-1</sup>, de acordo com a escala de McFarland e semeadas com alça de Drigalski no meio específico para cada bactéria. Em seguida, blocos de ágar circulares de 5 mm foram retirados das placas contendo as bactérias testadas, formando um orifício no meio de cultivo, onde foi inserido o extrato bruto a ser testado. O teste foi realizado em triplicata para todas as bactérias teste, organizadas em duas amostras diferentes por placa. O extrato considerado “Branco”, aquele onde foi obtido o extrato a partir do meio de cultivo sem crescimento, também foi testado.

As placas foram incubadas à 36°C por 24 h, sendo que os micro-organismos teste que necessitavam de condições de anaerobiose foram mantidos em jarras de Anaerobiose. Após 24 h de incubação, as placas foram avaliadas quanto à presença de halos de inibição para os extratos testados.

#### **4.8.2. AVALIAÇÃO QUANTITATIVA DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA**

A avaliação da atividade antimicrobiana foi realizada conforme o método de Microdiluição (CLSI, 2002; CLSI, 2003) estabelecido no Laboratório de Biotecnologia.

A atividade antimicrobiana dos extratos dos isolados de micro-organismos em estudo foi avaliada frente aos seguintes micro-organismos: *Neisseria meningitidis* W ATCC, *Neisseria meningitidis* Y USA, *Neisseria meningitidis* C 2135, *Neisseria meningitidis* B4.

Os micro-organismos foram reativados em meio Mueller-Hinton e repicados 24h antes dos ensaios de atividade antimicrobiana e mantidos em jarra de anaerobiose e estufa a 36°C para crescimento.

A determinação da Concentração Inibitória Mínima foi realizada de acordo com a metodologia descrita anteriormente. Após o período de 24 h de incubação, a leitura dos resultados foi realizada em espectrofotômetro a 625nm, e comparado com o controle negativo, que possui o meio de cultivo Muller-Hinton sem o crescimento de micro-organismos, o controle positivo que possui o inóculo de micro-organismo e o meio de cultivo, e o controle “Branco” que possui o extrato considerado “Branco”, o meio de cultivo e o inóculo de micro-organismos.

#### **4.9. IDENTIFICAÇÃO DOS COMPOSTOS PRESENTES NOS EXTRATOS BRUTOS, COM ATIVIDADE ANTIMICROBIANA, ATRAVÉS DA TÉCNICA DE CROMATOGRAFIA GASOSA ACOPLADA A DETECTOR DE MASSAS (GC-MS)**

O processo de identificação dos compostos presentes nos extratos brutos, bem como o fracionamento dos extratos, foram realizados na Divisão de Química de Produtos Naturais, CPQBA/UNICAMP, com orientação do Dr. Rodney Alexandre Ferreira Rodrigues.

O perfil cromatográfico dos extratos foi realizado utilizando o Cromatógrafo a gás marca Agilent, modelo 6890N/detector seletivo de massas Agilent 5975 e injetor automático Agilent 7683B (Palo Alto, CA, USA). A coluna utilizada foi HP-5MS, com fase estacionária quimicamente ligada, 5% difenil, 95% dimetil polisiloxano, (30 m x 0,25 µm de espessura de filme x 0,25 mm de diâmetro interno).

Os equipamentos operaram nas seguintes condições: temperatura da coluna: 60°C, (3°C/min), 240°C, temperatura do injetor: 220°C, temperatura do detector: 250°C. O modo de injeção empregado para o CG/MS foi *split*, com razão empregada de 1:40, e o volume injetado foi de 1,0 µL. Os extratos secos foram dissolvidos em acetato de etila PA previamente à injeção.

Os cromatogramas de íons totais (TIC, em inglês *Total Ion Chromatogram*) obtidos foram comparados com os espectros de massa da biblioteca NIST/2005 e a similaridade mínima entre os fragmentogramas do componente estudado quando comparado à biblioteca foi 90%.

#### **4.9.1. FRACIONAMENTO DOS EXTRATOS BRUTOS**

Foi utilizado como coluna cromatográfica um tubo de vidro nas dimensões 10 cm x 0,8 mm de diâmetro, similar a uma Pipeta de Pasteur. A coluna mencionada foi empacotada com 1 g de sílica-gel (Merck) como fase estacionária. Cada coluna foi devidamente identificada.

A separação cromatográfica das amostras foi realizada adicionando-se sílica-gel ao extrato bruto seco na proporção de 1:1, previamente dissolvido em acetato de etila com auxílio de um banho de ultrassom, a fim de permitir a homogeneização do extrato e facilitar sua mistura com a sílica-gel e possibilitar que o extrato bruto seco, que estava aderido ao vidro, desprendesse facilmente. A mistura do extrato bruto e da sílica-gel foi seca em rotaevaporador a 45°C, sob vácuo e assim o acetato de etila foi eliminado.

O extrato bruto misturado com sílica-gel foi colocado no topo da coluna já empacotada com sílica-gel, e adicionado 5 mL de n-hexano, um solvente apolar cujo propósito foi de separar possíveis componentes apolares do extrato bruto. Ao eluir através da coluna, o solvente carregou os compostos do extrato bruto que nele são solúveis e assim os componentes polares ficaram retidos na coluna devido sua interação com a sílica-gel, uma fase móvel polar. As frações obtidas foram coletadas em frasco de vidro para posterior análise cromatográfica. O mesmo procedimento foi realizado com os solventes de média polaridade, diclorometano, e com o solvente polar, metanol, que foi inserido duas vezes na coluna, desta forma foi realizado um gradiente de polaridade para a separação proposta. As frações geradas foram levadas ao rotaevaporador a 45 °C, sob vácuo, a fim de concentrá-las e as massas obtida de cada fração foram determinadas em balança analítica com o propósito de verificar o balanço de massas.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

### 5.1. ISOLAMENTO, PRESERVAÇÃO E REATIVAÇÃO DOS ISOLADOS

A coleta foi realizada na Baía do Almirantado (Ilha Rei George), Antártica (Figura 3), durante expedição pelo Programa Antártico Brasileiro no verão de 2010 na Estação Brasileira Comandante Ferraz. Foram obtidos 153 isolados de 19 tipos de amostras distintas, sendo estas: invertebrados marinhos (6 amostras), algas (6 amostras), líquen (1 amostra) (Figura 4), pedra com líquen (1 amostra), osso de baleia (1 amostra) e sedimento (4 amostras), os quais foram preservados pelo método de ultracongelamento a  $-80^{\circ}\text{C}$  na Divisão de Recursos Microbianos (CPQBA/UNICAMP).

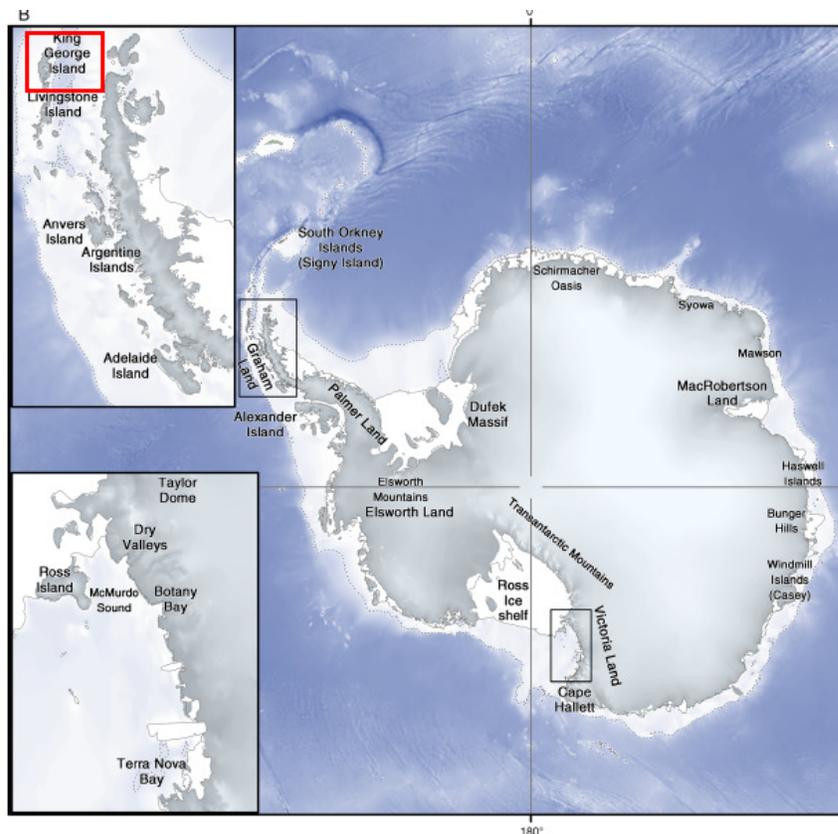


Figura 3. Representação do Continente Antártico e indicação da Ilha do Rei George, onde foi realizada a coleta do presente estudo. Fonte: Convey et al., 2010.

A Figura 5 indica a distribuição de micro-organismos isolados por meio de cultivo em cada amostra coletada. O meio M1 apresentou maior eficiência para o isolamento, resultando em 69,3% das bactérias, o meio ISP2 resultou em 20,9% das bactérias isoladas enquanto o meio NA apresentou 9,8%, das bactérias isoladas, sendo o meio que apresentou a menor eficiência de isolamento.

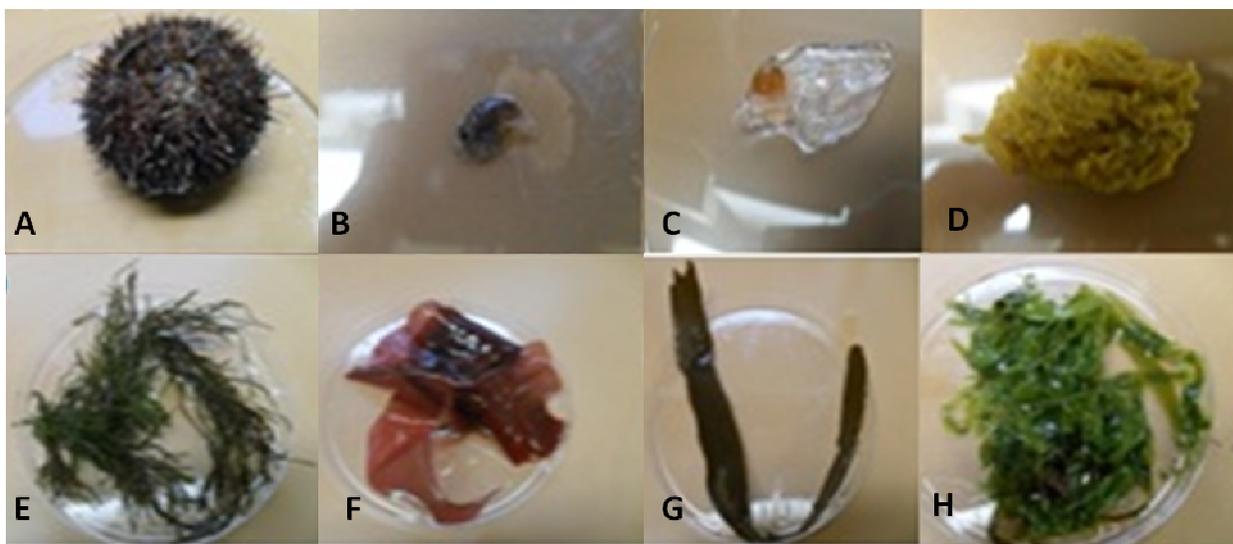


Figura 4. Material coletado no continente Antártico na expedição verão 2010 e utilizado para o isolamento de bactérias. A) – Ouriço-do-mar, B) – Ascídia; C) – Salpa; D) – Esponja; E, F, G, H) – Algas. Fonte: Fernando Suzigan Nobre.

O maior número de bactérias isoladas foi obtido no sedimento de dois pontos de coleta, na Estação Comandante Ferraz e Botanic Point, ambos com 20 isolados (13,1%) no total. A Alga 6 e Ascídia 2 apresentaram o menor número de isolados, uma bactéria (0,7%), as quais foram coletadas na Estação Comandante Ferraz.

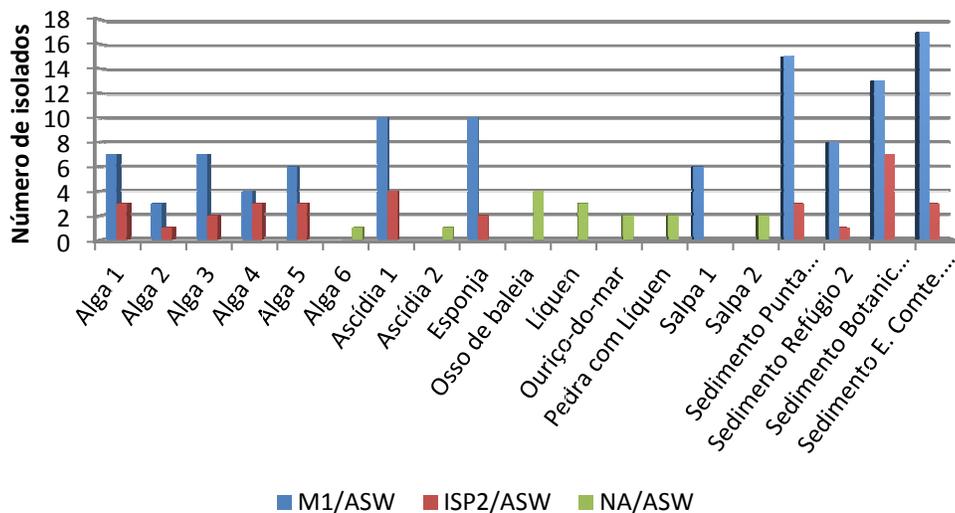


Figura 5. Distribuição do número de isolados por meio de cultivo para cada amostra coletada.

## 5.2. CARACTERIZAÇÃO DOS ISOLADOS POR TAXONOMIA CLÁSSICA

A análise dos 153 isolados com base em características morfológicas da colônia e das células foi utilizada como um recurso para avaliar a viabilidade e autenticidade dos isolados, identificando possíveis contaminações durante o isolamento. As informações referentes à caracterização por taxonomia clássica estão disponíveis no Anexo I.

## 5.3. SELEÇÃO DE ISOLADOS COM POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO PARA OS SISTEMAS PKS-I, PKS-II E NRPS.

Após a obtenção do DNA genômico foi realizada a triagem dos isolados através da amplificação dos genes *PKS-I*, *PKS-II* e *NRPS*. Para obter a melhor condição de reação, foram realizados testes com a linhagem *Chromobacterium violaceum* CBMAI 534<sup>T</sup>, pois esta linhagem apresenta diversos policetídeos, como o peptídeo FK228, promissor agente antitumoral (Cheng et al., 2007). Os testes permitiram obter a temperatura ideal de anelamento que corresponde a 55°C.

Os isolados foram avaliados quanto a presença dos genes *PKS-I*, *PKS-II* e *NRPS*, entre estes isolados 127 bactérias (83,0%) apresentaram pelo menos um dos genes

avaliados enquanto 26 bactérias (17,0%) não apresentaram nenhum deles. Os isolados considerados positivos incluem bactérias de todas as amostras. A Figura 6 indica que o gene PKS-II apresenta maior incidência entre os isolados avaliados, pois está presente em 101 bactérias (66,0%), a presença do gene NRPS foi observada em 88 bactérias (38,6%), enquanto o gene PKS-I foi observado em 55 bactérias (35,9%). Os três genes estavam presentes em 29 bactérias (19,0%).

Os peptídeos não-ribossomais (NRPs) e os policetídeos (PKs) são duas classes de produtos naturais com numerosos bioativos, como antivirais, antimicrobianos e antitumorais. Algumas vezes, a aplicação farmacêutica desses produtos é dificultada, pois muitos micro-organismos são difíceis de cultivar ou possuem baixa produtividade de compostos. Para solucionar esses problemas é importante conhecer os genes aos quais os metabólitos estão associados para criar estratégias de otimização do bioprocessamento. Após avaliar a produção de antimicrobianos é possível realizar uma produção heteróloga de híbridos de PKs, NRPs e PKs/NRPs usando *E.coli* como célula produtora (Li; Neubauer, 2014) permitindo, assim, a síntese de diversos compostos.

O potencial em produzir moléculas bioativas de bactérias do Filo Actinobacteria que são associadas a organismos marinhos, como corais, é através da avaliação da presença de genes do tipo *PKS-I*, *PKS-II* e *NRPS*. A comparação da variação genética dos genes é um indicador de potenciais moléculas bioativas serem produzidas pelo micro-organismo portador desse gene (Li et al., 2014).

O antibiótico tiomarinol A é um metabólito produzido pela bactéria marinha *Pseudoalteromonas* sp. SANK73390. Este antibiótico, biossintetizado através de um *cluster* de genes *PKS*, *NRPS* e *FAZ*, possui atividade contra bactérias Gram negativas e positivas, e é utilizada contra *Staphylococcus aureus* resistente a metilina (Murphy et al., 2014).

As bactérias associadas ao ambiente marinho e a ambientes extremos que possuem as vias biossintéticas pelos genes *PKS* e *NRPS*, são de grande potencial para a obtenção de compostos antimicrobianos.

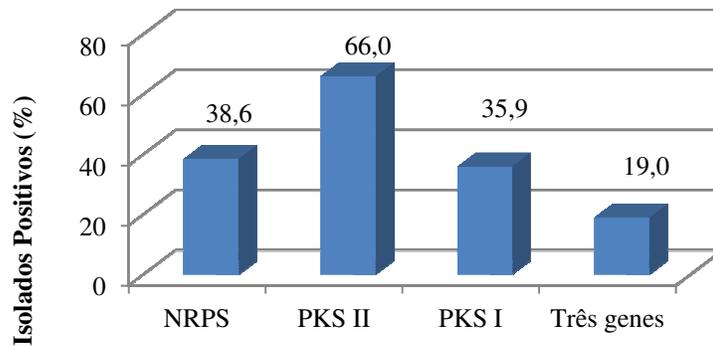


Figura 6. Incidência de cada gene *NRPS*, *PKS-I* e *PKS-II*, e dos três genes nas 127 bactérias isoladas.

#### 5.4. IDENTIFICAÇÃO DOS ISOLADOS

Após selecionar os isolados com potencial biotecnológico, foram obtidos 127 isolados (83% do total de isolados) que deveriam passar pela produção do extrato bruto e ser avaliados quanto à atividade antimicrobiana. Porém, obter o extrato bruto de 127 isolados se tornaria um processo que demanda muito tempo e apresenta custo elevado. Dessa forma, para reduzir o número de isolados foi realizada a identificação das bactérias através da análise parcial da sequência do gene RNA ribossomal 16S, a fim de obter o gênero de cada isolado e selecionar representantes distintos de cada gênero para produção do extrato bruto e avaliação da atividade antimicrobiana pelo MIC.

Além disso, conhecer o gênero dos isolados possibilita avaliar quais grupos são mais promissores quanto à produção de compostos bioativos e permite avaliar pela literatura os gêneros novos na qual não existem trabalhos avaliando a produção de compostos antimicrobianos.

##### 5.4.1. ANÁLISE PARCIAL DA SEQUÊNCIA DO GENE RNA RIBOSSOMAL 16S

Foram obtidas sequências parciais do gene RNA ribossomal 16S de 124 isolados dentre os 127 isolados selecionados. A obtenção das sequências e análise filogenética dos três isolados restantes não foi possível devido à dificuldade de amplificação do gene RNA

ribossomal 16S. Muito provavelmente os *primers* utilizados na amplificação do gene tem baixa especificidade para estes isolados.

A Figura 7 indica maior incidência do Filo Proteobacteria, com 82 isolados (64,6%), seguido pelo Filo Firmicutes com 24 isolados (18,9%), o Filo Actinobacteria com 15 isolados (11,8%) e o Filo com menor número de representantes foi o Bacteroidetes com três isolados (2,4%).

A identificação das bactérias pela análise parcial do gene ribossomal 16S mostrou que muitas das bactérias isoladas estão presentes em ambiente salino (Shivaji et al., 2005; Bozal et al., 1997; Akagawa-Matsushita et al., 1992; Gupta et al., 2006; Ishikawa et al., 2003) e de temperatura baixa (Reddy et al., 2002; Junge et al., 1998; Franzmann et al., 1993; Wietz et al., 2012; Van Trappen et al., 2004; Bowman et al., 1997; Reddy et al. 2004).

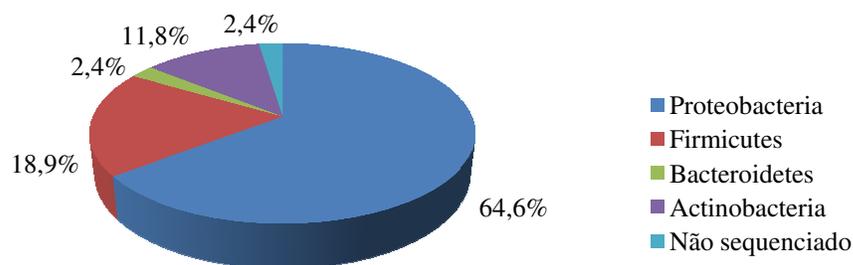


Figura 7. Distribuição das bactérias isoladas que incluem cada Filo, de acordo com a análise parcial da sequência do gene RNA ribossomal 16S, totalizando 28 gêneros distintos.

O Filo Firmicutes tem representantes de quatro gêneros (Figura 8), *Planococcus* (dez isolados), *Marinilactibacillus* (três isolados), *Carnobacterium* (quatro isolado), *Bacillus* (dois isolado) e *Staphylococcus* (dois isolado). O gênero *Planococcus* inclui espécies isoladas de ambientes marinhos e espécies endêmicas da Antártica, como o *Planococcus antarcticus* isolado de lagoas na Antártica (Reddy et al., 2002) e *Planococcus mcmeekinii* (Junge et al., 1998). O gênero *Marinilactibacillus* inclui duas espécies de ambiente marinho como *Marinilactibacillus psychrotolerans* uma bactéria psicrotolerante (Ishikawa et al., 2003) e *Marinilactibacillus piezotolerans* isolada de sedimentos profundos

do mar (Toffin et al., 2005). O gênero *Carnobacterium* apresenta espécies psicrotólicas como as espécies *Carnobacterium funditum* isolada de lagos da Antártica (Franzmann et al., 1993). O gênero *Bacillus* apresenta espécies que suportam condições extremas, como *Bacillus acidoterrestris* que toleram temperaturas extremas (Deinhard et al., 1988), como *Bacillus aureus* que foi isolado de um ambiente com grandes altitudes (Shivaji et al., 2006).

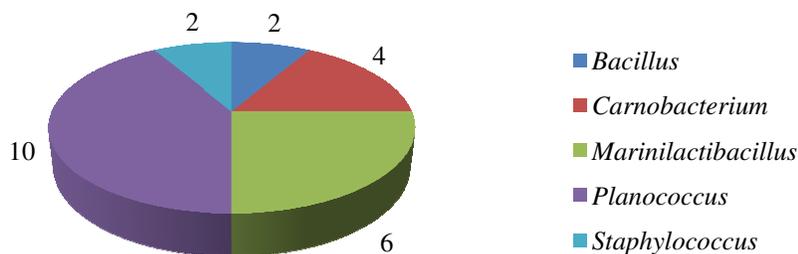


Figura 8. Distribuição dos gêneros do Filo Firmicutes, de acordo com a análise parcial da sequência do gene RNA ribossomal 16S, totalizando 24 isolados.

Os isolados do Filo Actinobacteria têm representantes dos gêneros (Figura 9) *Salinibacterium* (três isolados), *Brevibacterium* (dois isolados), *Saccharopolyspora* (dois isolados), *Streptomyces* (três isolados) e *Curobacterium*, *Arthrobacter*, *Dietzia*, *Nocardiopsis* e *Rhodococcus* com um representante de cada gênero. A partir de linhagens do gênero *Arthrobacter* sp. isolados do oceano Ártico foram obtidos compostos arthrobacilinas de atividade antimicrobiana (Wietz et al., 2012). O gênero *Salinibacterium* sp. contém espécies de ambiente marinho, sendo que *Salinibacterium xinjiangense* é uma espécie psicrófila (Zhang et al., 2008). O gênero *Brevibacterium* apresenta espécies tolerantes a condições extremas, como *Brevibacterium halotolerans* tolerante a altas concentrações de sal, e *Brevibacterium frigoritolerans* que tolera baixas temperaturas. No gênero *Saccharopolyspora* foram observadas linhagens com atividade antimicrobiana derivadas do sistema *PKS-I*, *PKS-II* e *NRPS* (Qin et al., 2009). O gênero *Streptomyces*, inclui espécies amplamente conhecidas pela produção de antibióticos e outros compostos bioativos. Novos antibióticos, como alnumicina, munumbicina A, B, C e D, e coronamicina foram derivados desse gênero (Castillo et al., 2002).

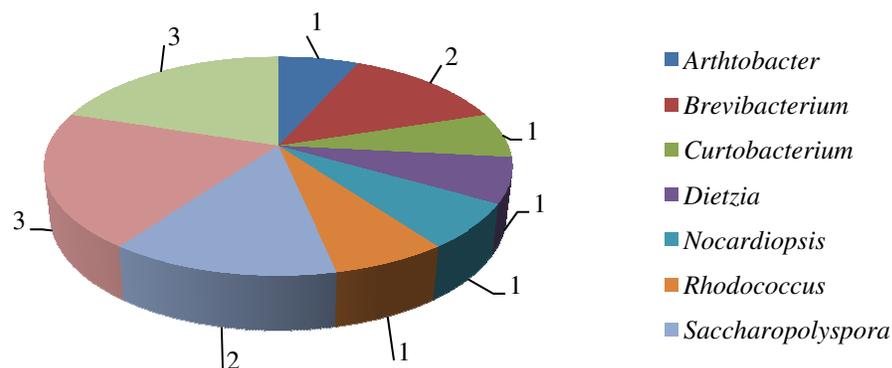


Figura 9. Distribuição dos gêneros do Filo Actinobacteria, de acordo com a análise parcial da sequência do gene RNA ribossomal 16S, totalizando 15 isolados.

O Filo Bacteroidetes apresenta um isolado do gênero *Algoriphagus* sp. e dois isolados do gênero *Zobellia* sp. O gênero *Algoriphagus* inclui espécies extremófilas e uma espécie que foi isolada de lagos da Antártica, *Algoriphagus antarcticus* (Van Trappen et al. 2004). O gênero *Zobellia* inclui espécies como *Zobellia amurskyensis* isolada do ambiente marinho (Nedashkovskaya et al. 2004).

A Figura 10 mostra a distribuição dos gêneros dentro do Filo Proteobacteria. A maior incidência foi do gênero *Psychrobacter*, ao qual 30 isolados (36,6%) fazem parte, sendo seguido pelo gênero *Pseudomonas*, com 19 isolados (23,2%), e do gênero *Pseudoalteromonas* com nove isolados (11,0%). Os gêneros da Família Enterobacteriaceae correspondem a nove isolados (11,0%), outros gêneros incluem *Marinobacter* (seis isolados), *Marinomonas* (dois isolado), *Marinilactibacillus* (seis isolados) *Stenotrophomonas* (dois isolado), *Sulfitobacter* (dois isolados) e *Shewanella* (três isolados).

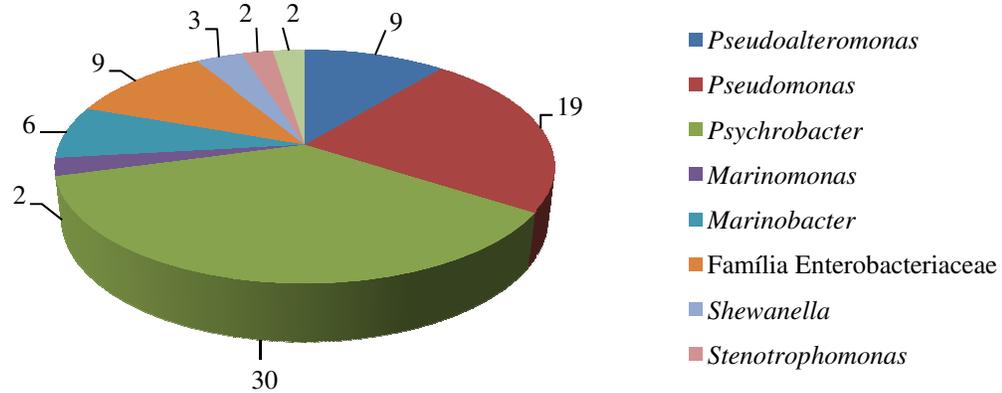


Figura 10. Distribuição dos gêneros do Filo Proteobacteria, de acordo com a análise parcial da sequência do gene RNA ribossomal 16S, totalizando 82 isolados.

O gênero *Psychrobacter* inclui 34 espécies que crescem em baixas temperaturas, sendo que muitas espécies desse gênero foram isoladas na Antártica como *Psychrobacter aquaticus*, isolada do ambiente marinho da Antártica (Shivaji et al., 2005), *Psychrobacter glacincola*, isolada do gelo presente no mar da Antártica (Bowman et al., 1997), *Psychrobacter frigidicola* isolada de solos ortogênicos (Bowman et al., 1996), *Psychrobacter fozii* encontrado em diversos locais da Antártica (Bozal et al., 2003), *Psychrobacter luti* isolada na lama glacial da Antártica (Bozal et al., 2003), entre outras espécies. Portanto, a maior prevalência desse gênero corresponde a tolerância que esses micro-organismos apresentam para sobreviver em ambientes de baixas temperaturas. O gênero *Pseudomonas* inclui espécies que foram isoladas de diversos ambientes, e, portanto é considerado um grupo de grande plasticidade genética. Este gênero pode estar associado ao ambiente marinho como *Pseudomonas alcaliphila*, espécie psicrófila alcalofílica isolada da água do mar (Yumoto et al. 2001), *Pseudomonas antarctica* isolada do sul da Antártica (Reddy et al., 2004), *Pseudomonas marincola* isolada de ambientes marinhos (Romanenko et al., 2008).

Neste estudo, o gênero *Pseudoalteromonas* corresponde a um número elevado de isolados, pois esse grupo apresenta espécies associadas ao ambiente Antártico e a água do mar, tais como as espécies *Pseudoalteromonas antarctica* isolada da costa da Antártica (Bozal et al., 1997), *Pseudoalteromonas prydzensis* isoladas do gelo do mar na Antártica

(Bowman, 1998), *Pseudoalteromonas atlantica* isolada do oceano Atlântico (Akagawa-Matsushita et al., 1992) e *Pseudoalteromonas bacteriolytica* isolada da água do mar (Sawabe et al., 1998).

Os gêneros *Marinobacter* sp. e *Marinomonas* sp. incluem espécies relacionadas ao ambiente marinho, e apresentam espécies isoladas na Antártica, como *Marinobacter antarcticus* isolada do sedimento (Liu et al., 2012), *Marinobacter guineae* (Montes et al., 2008) e *Marinomonas polaris* isolada da água do mar (Gupta et al., 2006). Uma espécie do gênero *Sulfitobacter* também foi encontrada na Antártica, a *Sulfitobacter brevis* isolada de um lago hipersalino.

O gênero *Shewanella* é conhecido pela produção da neurotoxina tetrodotoxina. Barbieri et al. (1997) mostraram que a espécie *Shewanella pealeana* apresentou baixa atividade antimicrobiana contra micro-organismos patogênicos.

A partir da identificação em nível de gêneros, 20 destes foram imediatamente selecionados para produção do extrato bruto e avaliação da atividade antimicrobiana pelo método de MIC, por apresentarem um número reduzido de representantes de um mesmo gênero (Tabela 2), totalizando 48 isolados, além de três isolados que não foram identificados quanto em nível de gênero. Cerca de 76 isolados não foram imediatamente selecionados para a produção de extratos brutos, dentre esses, 65 isolados alocados em quatro gêneros distintos (*Planococcus*, *Marinilactibacillus*, *Psychrobacter* e *Pseudomonas*) (Tabela 3), apresentavam maior número de isolados pertencentes a um mesmo gênero, e foi necessária uma abordagem distinta para selecionar alguns representantes desses gêneros para a produção de extratos brutos. E os 11 isolados restantes estavam alocados em quatro gêneros (*Bacillus*, *Escherichia*, *Enterobacter* e *Pantoea*) (Tabela 3), mesmo não havendo um número elevado de representantes desses gêneros, optamos por não selecionar imediatamente tais esses isolados para a produção de extratos brutos, já que estes gêneros poderiam ser patogênicos ou fonte de contaminação ambiental.

Dessa forma, para reduzir o número de bactérias a serem submetidas a produção de extratos brutos, as bactérias pertencentes ao oito gêneros (Tabela 3) foram submetidos à avaliação qualitativa da atividade antimicrobiana. Essa abordagem reduziu o número de

isolados para produção de extratos brutos e avaliação da atividade antimicrobiana pelo método da microdiluição. Além disso, essa abordagem possibilitou avaliar a produção de compostos antimicrobianos por uma maior diversidade de gêneros de bactérias identificadas.

Tabela 2. Isolados de bactérias selecionados para a produção de extrato bruto.

<b>Filo</b>	<b>Gênero</b>	<b>Origem</b>	<b>Isolado</b>
<b>Actinobacteria</b>	<i>Arthrobacter</i> sp.	Sedimento	80
	<i>Brevibacterium</i> sp.	Sedimento	48 e 104
	<i>Curtobacterium</i> sp.	Alga	100
	<i>Dietzia</i> sp.	Alga	69
	<i>Nocardiosis</i>	Alga	133
	<i>Rhodococcus</i> sp.	Sedimento	103
	<i>Saccharopolyspora</i> sp.	Alga	130 e 136
	<i>Salinibacterium</i> sp.	Sedimento	85, 90 e 122
	<i>Streptomyces</i> sp.	Alga e Salpa	128, 131 e 138
<b>Bacteroidetes</b>	<i>Algoriphagus</i> sp.	Sedimento	111
	<i>Zobellia</i> sp.	Sedimento e Ascídia	10 e 96
<b>Firmicutes</b>	<i>Carnobacterium</i> sp.	Esponja e Ascídia	87, 95, 106 e 108
	<i>Staphylococcus</i> sp.	Alga e Sedimento	129 e 132
<b>Proteobacteria</b>	<i>Marinobacter</i> sp.	Sedimento	3, 9, 11, 47, 88 e 91
	<i>Marionomonas</i> sp.	Esponja e Alga	38 e 116
	<i>Pseudoalteromonas</i> sp.	Sedimento e Ascídia	6, 17, 45, 46, 52, 53, 76 e 81
	<i>Shewanella</i> sp.	Alga	49, 68 e 120
	<i>Stenotrophomonas</i> sp.	Alga	50 e 126
	<i>Sulfitobacter</i> sp.	Alga e Sedimento	74 e 92
	<i>Thalassomonas</i> sp.	Ascídia	44
<b>Sem identificação</b>			75, 127 e 135

Tabela 3. Isolados de bactérias selecionados para a avaliação qualitativa da produção de antimicrobianos

Filo	Gênero	Quantidade de isolados
<b>Firmicutes</b>	<i>Bacillus</i>	2
	<i>Marinilactibacillus</i>	6
	<i>Planococcus</i>	10
<b>Proteobacteria</b>	<i>Enterobacter</i>	5
	<i>Escherichia</i>	3
	<i>Pantoea</i>	1
	<i>Pseudomonas</i>	19
	<i>Psychrobacter</i>	30

### 5.5. AVALIAÇÃO QUALITATIVA DA PRODUÇÃO DE ANTIMICROBIANOS PARA OS ISOLADOS DOS GÊNEROS *Bacillus*, *Planococcus*, *Marinilactibacillus*, *Psychrobacter*, *Pseudomonas*, *Escherichia*, *Enterobacter* e *Pantoea*.

Após o teste do Bloco de Gelose com 76 isolados, foram observados halos de inibição formados por 30 deles que foram selecionados para a produção de extratos brutos (Tabela 4). Dentre eles, foi observada formação de halo de inibição de intensidade Baixa (7,0 a 10,0 mm) e Moderada (11,00 a 14,0 mm) e Alta (>14,0) contra os quatro micro-organismos indicadores: *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Micrococcus luteus*.

Após a avaliação da literatura foram considerados que os gêneros *Bacillus*, *Escherichia*, *Enterobacter* e *Pantoea* não são de interesse para o estudo da produção de antimicrobianos, já que os gêneros *Escherichia*, *Enterobacter* e *Pantoea* podem não estar associados ao ambiente antártico de como microbiota natural, mas sim pela influência humana no ambiente. Esses três gêneros da família Enterobacteriaceae possuem espécies como *Escherichia coli* que coloniza o trato gastrointestinal humano e de outros mamíferos (Kaper et al., 2004), *Pantoea agglomerans* é uma bactéria patogênica oportunista humana (Delétoile et al., 2008) e o gênero *Enterobacter* é um importante patógeno presente em hospitais, tornando-se multirresistentes às drogas (Ye et al., 2006). O gênero *Bacillus*, Família Bacillaceae, possui 293 espécies (LPSN), que habitam diversos tipos de

ecossistemas e pode-se caracterizá-lo como um gênero generalista. Portanto, como o foco deste trabalho se dá no ambiente antártico, os gêneros indicados não foram priorizados para a busca de novos compostos antimicrobianos.

O gênero *Marinilactibacillus*, por se tratar de um gênero novo, por possui duas espécies descritas nos anos de 2003 (Ishikawa et al. 2003) e 2005 (Toffin et al. 2005) foi selecionado para avaliação da atividade antimicrobiana. O teste qualitativo da atividade antimicrobiana possibilita avaliar de forma preliminar a produção de antimicrobianos que ainda não são conhecidos por essas espécies, para obter novas informações sobre novos compostos obtidos a partir desse gênero, todos os isolados de *Marinilactibacillus* foram selecionados para a produção de extratos brutos.

Os gêneros *Planococcus*, *Pseudomonas* e *Psychrobacter* foram selecionados devido ao número elevado de micro-organismos isolados no ambiente antártico pertencentes a esses gêneros, dessa forma para reduzir o número de representantes desses gêneros, os mesmos foram selecionados para a análise qualitativa da produção de composto antimicrobianos.

Como indicado na Tabela 3, foram obtidos resultados de inibição dos gêneros: *Planococcus* (sete isolados) *Marinilactibacillus* (seis isolados) *Psychrobacter* (nove isolados) e *Pseudomonas* (oito isolados), totalizando 30 isolados entre os 76 avaliados. Os 30 isolados foram imediatamente selecionados para a produção de extratos, o que significa que foram produzidos no total 81 extratos brutos.

Entre os isolados que produziram antimicrobianos capazes de formar halo de inibição, foi observada a presença de halos de inibição de intensidade baixa e moderada para os quatro indicadores, (Figura 11), porém apenas foi observado halo de intensidade alta frente os micro-organismos *Micrococcus luteus* e *Escherichia coli*. Os isolados que apresentaram alta inibição frente o indicador *Micrococcus luteus* foi o isolado ANT\_B35, do gênero *Planococcus*, e os isolados ANT\_B41, ANT\_B93 e ANT\_B110 do gênero *Psychrobacter*. Frente ao indicador *Escherichia coli* o isolado ANT\_B86, do gênero *Psychrobacter*, destacou-se em frente aos outros por formar halo de inibição de intensidade alta.

Tabela 4. Tipo de inibição gerada por isolados de bactérias frente aos micro-organismos indicadores avaliados no Teste do Bloco de Gelose, após 96 horas.

Gênero	Isolado	Tipo de inibição frente cada micro-organismo indicador			
		<i>Candida albicans</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Micrococcus luteus</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>Planococcus</i>	ANT_B33			Moderada	Moderada
	ANT_B35			Alta	
	ANT_B61			Baixa	
	ANT_B63			Baixa	
	ANT_B82	Moderada		Baixa	Moderada
	ANT_B112			Baixa	
	ANT_B 114			Baixa	
<i>Marinilactibacillus</i>	ANT_B 65		Moderada	Baixa	
	ANT_B 94				Baixa
	ANT_B 105		Baixa		
	ANT_B 107			Baixa	
	ANT_B 115			Baixa	
	ANT_B 118	Baixa	Moderada		
<i>Psychrobacter</i>	ANT_B 29		Baixa	Moderada	
	ANT_B 34	Moderada		Alta	
	ANT_B36			Moderada	Baixa
	ANT_B41	Moderada		Alta	
	ANT_B62	Moderada			
	ANT_B78				Baixa
	ANT_B86		Moderada	Moderada	Alta
	ANT_B93			Alta	
ANT_B110			Alta		
<i>Pseudomonas</i>	ANT_B5		Moderada	Moderada	
	ANT_B102		Moderada	Moderada	
	ANT_B113		Baixa		
	ANT_B140	Baixa		Moderada	Moderada
	ANT_B142			Baixa	
	ANT_B144			Baixa	Baixa
	ANT_B146	Moderada			
	ANT_B151				Moderada

A maior incidência de halos de inibição foi frente *Micrococcus luteus*, com 22 isolados, sendo que entre este número, 10 isolados inibiram apenas este indicador e nenhum dos outros três. Para cada indicador, foram observados isolados que apresentaram atividade

inibitória única, ou seja, apenas para um indicador. Para *Candida albicans* apenas o isolado ANT\_B62 (*Psychrobacter*) apresentou atividade inibitória única, para *Staphylococcus aureus* foi o isolado ANT\_B105 (*Marinilactibacillus*), e para o indicador *Escherichia coli* foram os isolados ANT\_B94 (*Marinilactibacillus*) e ANT\_B78 (*Psychrobacter*).

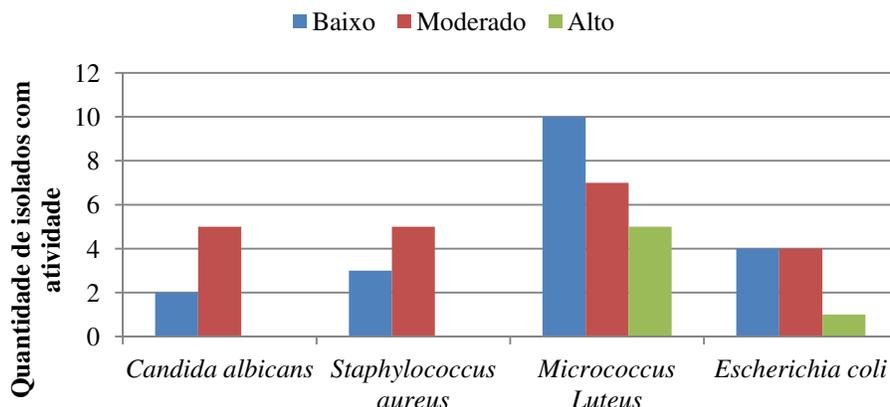


Figura 11. Isolados que apresentaram inibição contra os micro-organismos indicadores nas intensidades Baixa, Moderada e Alta.

## 5.6. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

Foram obtidos 81 extratos brutos a partir de 81 isolados de bactérias, que correspondem a 25 gêneros. Os extratos foram nomeados com o mesmo número do isolado, porém com a letra “E” em frente ao número, como por exemplo, o extrato obtido do isolado ANT\_B131 do gênero *Streptomyces* que foi denominado como E131.

Os extratos foram avaliados contra oito micro-organismos indicadores, *Bacillus subtilis* ATCC 6051, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 13388, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Escherichia coli* ATCC 11775, *Staphylococcus epidermides* ATCC 12228, *Salmonella choleraesuis* ATCC 10708, *Micrococcus luteus* ATCC 4698, *Candida albicans* ATCC 10231.

Dentre os extratos analisados, 18 apresentaram atividade antimicrobiana através da técnica de Concentração Inibitória Mínima (Tabela 5). Os extratos apresentaram atividade inibitória contra os micro-organismos *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*,

*Micrococcus luteus*, *Escherichia coli* e *Candida albicans*, com valores que variam entre 0,25 a 2,0 mg.mL<sup>-1</sup>.

Foram obtidas seis amostras de extratos brutos correspondentes às amostras consideradas controle negativo do extrato. Nesses casos, não foi inoculado nenhum micro-organismo antes do momento de incubação do meio de cultivo, portanto foi realizada a extração apenas do meio de cultivo, para avaliar se algum composto do meio ou algum vestígio de reagente do processo de extração poderiam ocasionar na inibição das bactérias indicadoras durante o estudo do MIC. Os controles negativos de cada lote de extratos brutos produzidos não ficaram turvos após o período de incubação das amostras. Os controles negativos foram avaliados em triplicata juntamente com os extratos de bactérias na avaliação de MIC, e não apresentaram atividade inibitória contra os micro-organismos indicadores testados.

Para o indicador *Staphylococcus aureus*, 12 extratos brutos apresentaram atividade antimicrobiana (Tabela 5), e o MIC variou de 0,5 mg.mL<sup>-1</sup> a 2,0 mg.mL<sup>-1</sup>. Atividade bactericida, ou seja, aquela que promove a morte da bactéria, foi observada para três extratos brutos, e nove extratos apresentaram atividade bacteriostática, ou seja, aquela que promove a inibição do crescimento da bactéria

Os resultados promissores foram observados nos extratos obtidos dos isolados ANT\_B44 e ANT\_B76, ambos do gênero *Pseudoalteromonas*, sendo que ambos apresentaram o MIC 0,5 mg.mL<sup>-1</sup> e CBM 1,0 mg.mL<sup>-1</sup>. Devido aos resultados semelhantes, a identificação dos isolados permitirá conhecer se ambos isolados são da mesma espécie e a análise dos extratos por Cromatografia Gasosa Acoplada ao Espectômetro de Massas (GC-MS) permitirá conhecer se esses isolados produzem compostos semelhantes, que são possíveis de identificar pela técnica.

Para o indicador *Bacillus subtilis*, 13 extratos apresentaram atividade antimicrobiana e o MIC variou de 0,5 mg.mL<sup>-1</sup> a 2,0 mg.mL<sup>-1</sup>. A atividade bactericida foi observada para cinco extratos brutos e oito extratos apresentaram atividade bacteriostática. Os resultados promissores foram observados nos extratos obtidos dos isolados ANT\_B44, gênero *Pseudoalteromonas*, MIC 1,0 mg.mL<sup>-1</sup> e CBM 1,0 mg.mL<sup>-1</sup>, isolado ANT\_B114, gênero

*Planococcus*, MIC 1,0 mg.mL<sup>-1</sup> e CBM 1,0 mg.mL<sup>-1</sup>, isolado ANT\_B131, gênero *Streptomyces*, MIC 0,5 mg.mL<sup>-1</sup> e CBM 1,5 mg.mL<sup>-1</sup>.

Para o indicador *Micrococcus luteus*, nove extratos apresentaram atividade bacteriostática, e o MIC variou de 0,25 mg.mL<sup>-1</sup> a 2,0 mg.mL<sup>-1</sup>. O valor de MIC de 0,25 mg.mL<sup>-1</sup> foi obtido pelo isolado ANT\_B131, *Streptomyces*. Frente ao indicador *Escherichia coli*, três extratos apresentaram atividade bacteriostática e um extrato apresentou atividade bactericida. O único extrato que apresentou atividade bactericida, foi obtido do isolado ANT\_B44, gênero *Pseudoalteromonas*, com MIC 1,0 mg.mL<sup>-1</sup> e CBM 1,0 mg.mL<sup>-1</sup>.

O extrato do isolado ANT\_B131, gênero *Streptomyces*, foi o único a apresentar atividade antimicrobiana frente o indicador *Candida albicans*, com MIC 1,5 mg.mL<sup>-1</sup> e CBM 1,5 mg.mL<sup>-1</sup>.

A atividade antimicrobiana frente aos indicadores *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 13388 *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228, *Salmonella choleraesuis* ATCC 10708, não foi observada pelos extratos brutos obtidos no presente estudo, que foram avaliados em concentrações abaixo de 2,0 mg.mL<sup>-1</sup>.

Romoli et al. (2011) avaliaram a atividade antimicrobiana de 11 bactérias oriundas de esponjas do mar, presentes na superfície do mar da Antártica. Duas linhagens associadas ao gênero *Pseudoalteromonas* foram capazes de inibir o crescimento de cepas de *Burkholderia*, de origem de pacientes de fibrose cística, do ambiente e de pacientes com infecções nosocomiais. As linhagens de *Pseudoalteromonas* sp. produziram compostos orgânicos voláteis, que passaram por análise pela técnica de GC-MS.

Em estudo realizado por Ascencio e colaboradores (2014), a bactéria *Janthinobacterium lividum* isolada de uma amostra do solo da Península Fields, localizada na Ilha do Rei George, Antártica, cujo extrato etanólico foi obtido e testado em ensaio antimicrobiano contra *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Salmonella typhimurium* ATCC 14028, *Kocuria rhizophila* ATCC 9341 e cepas multirresistentes. Foi observado potencial de inibição através da formação do halo de inibição e resultados do MIC. Através do perfil químico dos compostos, foi deduzido que o

composto, que corresponde a 35% do extrato, é a violaceína, composto conhecido por possuir propriedades antimicrobianas e antitumorais.

Micro-organismos isolados do solo da Ilha Haswell, Antártica, foram avaliadas quanto ao potencial de inibição através do método de difusão de ágar e apresentaram atividade antimicrobiana contra *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Candida tropicalis* e *Cladosporidium cladosporioides*. As bactérias pertencem ao Filo Actinobacteria e foram identificadas como *Streptomyces* sp., *Nocardia* sp. e *Geodermatophilus* sp (Gesheiva; Negoita, 2011).

Bactérias isoladas das esponjas *Anoxycalyx joubini* e *Lissodendoryx nobilis*, coletadas na Baía Terra Nova, Antártica, apresentaram atividade antimicrobiana quando avaliadas através do teste de cross-streak. O teste permitiu verificar a atividade antimicrobiana das linhagens isoladas do ambiente Antártico contra elas mesmas, Morgano e colaboradores (2009) observaram que as linhagens com atividade antimicrobiana pertenciam aos gêneros *Pseudoalteromonas*, *Shewanella* e *Psychrobacter*.

Tabela 5. Avaliação da atividade antimicrobiana, pelo Método de Micro-diluição, de extratos brutos obtidos por bactérias isoladas do ambiente Antártico contra micro-organismos indicadores.

Extrato	Gênero	<i>Staphylococcus aureus</i>		<i>Bacillus subtilis</i>		<i>Micrococcus luteus</i>		<i>Escherichia coli</i>		<i>Candida albicans</i>	
		MIC (mg.mL <sup>-1</sup> )	CBM (mg.mL <sup>-1</sup> )								
E5	<i>Pseudomonas</i>	-	-	-	-	2,0	-	-	-	-	-
E6	<i>Pseudoalteromonas</i>	2,0	-	-	-	-	-	-	-	-	-
E38	<i>Marinomonas</i>	0,5	-	0,5	-	-	-	-	-	-	-
E44	<i>Pseudoalteromonas</i>	0,5	1,0	1,0	1,0	1,0	-	1,0	1,0	-	-
E46	<i>Pseudoalteromonas</i>	2,0	-	2,0	2,0	2,0	-	-	-	-	-
E50	<i>Stenotrophomonas</i>	1,0	-	1,0	-	2,0	-	2,0	-	-	-
E53	<i>Pseudoalteromonas</i>	-	-	-	-	2,0	-	-	-	-	-
E61	<i>Planococcus</i>	2,0	2,0	1,0	-	-	-	-	-	-	-
E75		-	-	1,0	-	-	-	-	-	-	-
E76	<i>Pseudoalteromonas</i>	0,5	1,0	2,0	-	1,0	-	2,0	-	-	-
E108	<i>Carnobacterium</i>	1,0	-	1,0	-	0,5	-	-	-	-	-
E111	<i>Algoriphagus</i>	-	-	-	-	2,0	-	-	-	-	-
E114	<i>Planococcus</i>	-	-	1,0	1,0	-	-	-	-	-	-
E128	<i>Streptomyces</i>	-	-	2,0	2,0	-	-	-	-	-	-
E131	<i>Streptomyces</i>	2,0	-	0,5	1,5	0,25	-	-	-	1,5	1,5
E136	<i>Saccharopolyspora</i>	2,0	-	-	-	-	-	-	-	-	-
E144	<i>Pseudomonas</i>	2,0	-	2,0	-	-	-	2,0	-	-	-
E146	<i>Pseudomonas</i>	0,5	-	1,0	-	-	-	-	-	-	-

## 5.7. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA FRENTE CEPAS VIRULENTAS

Para avaliação da atividade antimicrobiana frente as cepas virulentas, foram utilizados os extratos brutos que apresentaram atividade inibitória no teste de MIC anterior, E5, E44, E50, E61, E111, E114, E128 e E136. Foram incluídos os extratos brutos E65, E105 e E118 do gênero *Marinilactibacillus*, que não apresentaram atividade na avaliação do MIC descrita anteriormente, porém foram incluídos por serem gêneros de bactérias descritos nos últimos 15 anos, cuja produção de compostos antimicrobianos ainda não é conhecida.

No experimento de Disco-difusão de ágar, houve formação de halo de inibição para as quatro cepas de *Neisseria meningitidis*, W ATCC, Y USA, C2135 e B4. Os extratos obtidos dos isolados do gênero *Marinilactibacillus*, foram capazes de inibir as cepas virulentas de *N. meningitidis*, com maior destaque para o extrato E65 que inibiu as quatro cepas estudadas (Tabela 6). Os extratos E6, E38, E46, E53, E65, E75, E76 e E131 foram capazes de inibir as quatro cepas de *Neisseria meningitidis*, enquanto o extrato E105 foi capaz de inibir duas cepas, W ATCC e B4, e o extrato E108 foi capaz de inibir uma cepa, C 2135 e YUSA, respectivamente. O extrato E118 não foi capaz de inibir nenhuma das cepas estudadas, inclusive as da espécie *Neisseria meningitidis*. Não foi observada formação de halo de inibição para as cepas virulentas de *Streptococcus pyogenes*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Haemophilus influenzae* e *Streptococcus pneumoniae* (Tabela 6).

O gênero *Neisseria*, família Neisseriaceae, é caracterizadas por bactérias diplococos Gram-negativas e foram descritas até o momento 29 espécies do gênero (EUZÉBY, 1997). Na área da saúde, destacam-se duas espécies: *N. gonorrhoeae*, causadora da gonorreia, e *N. meningitidis*, um organismo humano-específico que causa a meningite bacteriana. A meningite é uma infecção bacteriana das membranas que envolvem o cérebro e medula espinhal.

A classificação de *N. meningitidis* é baseada nas grandes porinas da membrana externa e em sorotipos e subserotipos baseadas nos lipopolissacarídeos (LPS) em imunotipos.

Adicionalmente, a técnica de *multi-locus sequence typing* (MLST) classifica as cepas em sequências tipo baseada na variação entre sete genes *housekeeping*. Ao todo, 13 sorogrupos de meningococos têm sido descritos (A, B, C, D, 29E, H, I, K, L, Y, W-135, X e Z) (Hill et al., 2010). Os surtos de meningite bacteriana estão associados aos sorogrupos A, B, C, Y, W-135 e X (Organização Mundial da Saúde, 2012). A meningite bacteriana na Europa e na América é predominantemente causada por sorogrupos B e C, os sorogrupos B, C e Y causam surtos de epidemia na América, enquanto na África e Ásia os principais sorogrupos são A, C e W-135 (Khatami; Pollard, 2010).

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (2012) a meningite bacteriana afeta pessoas jovens com idade entre 1 a 30 anos, ocorrendo em pequenos surtos pelo mundo, com exceção do “Cinturão Africano da Meningite” onde os surtos são comuns, o local que contempla a África Subsaariana, que se estende de Mali à Etiópia. Quando a doença é diagnosticada cedo e o paciente recebe tratamento adequado, 5% a 10% dos pacientes chegam a óbito, tipicamente com 24 a 48 h após o início dos sintomas, sem tratamento mais de 50% dos casos chegam a óbito. A doença pode ocasionar danos no cérebro, perda auditiva ou deficiência no aprendizado em uma taxa de 10% até 20% dos sobreviventes.

A prevenção é realizada através de três tipos de vacinas disponíveis há mais de 30 anos, estas podem ser bivalentes, para os sorogrupos A e C, trivalentes, para os sorogrupos A, C e W, ou tetravalentes, sorogrupos A, C, Y e W135 (Organização Mundial da Saúde, 2012). Para o sorogrupo B não existiam vacinas disponíveis devido ao mimetismo antigênico com os polissacarídeos nos tecidos neurológicos humanos (Hill et. al., 2010). As vacinas para o sorogrupo B foi recentemente aprovada na Europa, denominada 4CMenB, e envolve multicomponentes do sorogrupo B e sua eficácia foi testada em 7500 adultos, crianças e infantes (Martin; Snape, 2013). Porém, a Organização Mundial da Saúde (OMS) ainda não considera essa vacina usada na profilaxia da meningite, já que de acordo com a organização, as vacinas para o sorogrupo B estão em fase final de desenvolvimento.

O tratamento é realizado através da administração de antibióticos beta-lactâmicos como cefalosporinas e penicilinas, cuja resistência é dificilmente reportada (Hill et. al., 2011). Em momentos de epidemia em locais como a África, cuja infraestrutura e recursos

são limitados, apenas o cloranfenicol e a ceftriaxona são antimicrobianos escolhidos, pois com apenas uma dose única são efetivos (Organização Mundial da Saúde, 2012).

As linhagens de *N. meningitidis* foram testadas quanto a Concentração Inibitória Mínima frente aos 12 extratos brutos (Tabela 7). Os valores de MIC variaram entre 2,0 mg.mL<sup>-1</sup> a 0,0156 mg.mL<sup>-1</sup> (ou 15,6 µg.mL<sup>-1</sup>). Os controles negativos utilizados no teste anterior de MIC foram utilizados nesse experimento e não apresentaram atividade inibitória frente as cepas virulentas.

Frente a cepa B4, oito extratos apresentaram atividade antimicrobiana, cuja MIC variou de 0,125 mg.mL<sup>-1</sup> pelos extratos E76 e E146 de origem dos isolados *Pseudoalteromonas* sp. e *Pseudomonas* sp., respectivamente, até 2,0 mg.mL<sup>-1</sup>, pelo extrato E131 obtida do isolado do gênero *Streptomyces* sp. Como não há vacina estabelecida pela OMS como método profilático contra esse tipo de sorogrupo, é importante que existam antimicrobianos eficientes para conter uma epidemia causada por ele. Além de que a busca por antimicrobianos de maior eficácia possibilita o aumento das chances de recuperação do pacientes, já que até 10% dos indivíduos diagnosticados com meningite chegam a óbito nas primeiras 48 h após o início dos sintomas.

A atividade antimicrobiana frente ao sorogrupo C2135 foi positiva para sete extratos brutos, cujo MIC variou de 0,0156 mg.mL<sup>-1</sup> pelo extrato E146, até 2,0 mg.mL<sup>-1</sup> pelo extrato E131. Outro resultado relevante foi o obtido pelo extrato E76 com valor de 0,0625 mg.mL<sup>-1</sup>. Frente ao sorogrupo WATCC, uma cepa vacinal, foi observada atividade antimicrobiana com quatro extratos brutos, e além de ser o menor número de extratos que causaram inibição durante o teste, ainda foram obtidos os menores valores de MIC, que variou entre 0,25 mg.mL<sup>-1</sup> pelos extratos E6 e E46, ambos obtidos de isolados do gênero *Pseudoalteromonas*, até 2,0 mg.mL<sup>-1</sup> pelo extrato E131.

Tabela 6. Inibição de cepas virulentas a partir de método de disco-difusão em ágar com extratos obtidos de bactérias da Antártica. Presença (+) e Ausência (-) de halos de inibição.

Micro-organismos	E6 4mg.mL <sup>-1</sup>	E38 2mg.mL <sup>-1</sup>	E46 4mg.mL <sup>-1</sup>	E53 16mg.mL <sup>-1</sup>	E65 8mg.mL <sup>-1</sup>	E75 4mg.mL <sup>-1</sup>	E76 8mg.mL <sup>-1</sup>	E105 8mg.mL <sup>-1</sup>	E108 8mg.mL <sup>-1</sup>	E118 8mg.mL <sup>-1</sup>	E131 8mg.mL <sup>-1</sup>	E144 8mg.mL <sup>-1</sup>	E146 4mg.mL <sup>-1</sup>
<i>Streptococcus pyogenes</i> KPJF3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Streptococcus pyogenes</i> K48	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 31 NM	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PA 765F	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PA ATCC	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PA 37F	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i> BEC	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i> Rib 1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Escherichia coli</i> EC 530	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Escherichia coli</i> DT	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Escherichia coli</i> 342	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Haemophilus influenzae</i> Rd	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Streptococcus pneumoniae</i> Pn 360	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Streptococcus pneumoniae</i> Pn 3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Pn Hc</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Neisseria meningitidis</i> W ATCC	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+
<i>Neisseria meningitidis</i> Y USA	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+
<i>Neisseria meningitidis</i> C 2135	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+
<i>Neisseria meningitidis</i> B4	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+

Quanto ao sorogrupo YUSA, de maior predominância na América (Khatami; Pollard, 2010), sete extratos apresentaram atividade inibitória cujo MIC variou de 0,0313 mg.mL<sup>-1</sup> pelo extrato E146 até 2,0 mg.mL<sup>-1</sup> pelo extrato E131. Além do E146, destacam-se os extratos E46 e E76 valor de 0,0625 mg.mL<sup>-1</sup>.

Os extratos que não apresentaram atividade inibitória para alguns sorogrupos no teste de disco-difusão, como E65, E75, E105 e E108, não foram testados pelo método de microdiluição para verificação da MIC conforme indica a Tabela 7.

Tabela 7. Avaliação da atividade antimicrobiana de extratos brutos frente a *Neisseria meningitidis*, pelo método de Micro-diluição.

Extrato	Gênero	B4	C 2135	W ATCC	Y USA
		MIC mg.mL <sup>-1</sup>	MIC mg.mL <sup>-1</sup>	MIC mg.mL <sup>-1</sup>	MIC mg.mL <sup>-1</sup>
E6	<i>Pseudoalteromonas</i>	0,25	0,5	0,25	0,25
E38	<i>Marinomonas</i>	0,50	-	-	-
E46	<i>Pseudoalteromonas</i>	0,25	0,125	0,25	0,0625
E53	<i>Pseudoalteromonas</i>	-	-	-	-
E65	<i>Marinilactibacillus</i>	n.t.	-	n.t.	2,0
E75	Sem identificação	0,50	n.t.	0,5	n.t.
E76	<i>Pseudoalteromonas</i>	0,125	0,0625	-	0,0625
E105	<i>Marinilactibacillus</i>	-	n.t.	-	n.t.
E108	<i>Carnobacterium</i>	n.t.	0,125	n.t.	0,125
E131	<i>Streptomyces</i>	2,0	2,0	2,0	2,0
E144	<i>Pseudomonas</i>	0,50	0,5	-	-
E146	<i>Pseudomonas</i>	0,125	0,0156	-	0,0313

(n.t.) não testado

(-) não houve inibição do micro-organismo indicador

## 5.8. IDENTIFICAÇÃO POR TAXONOMIA MOLECULAR DOS ISOLADOS

A identificação dos isolados foi baseada na análise filogenética da sequência do gene RNA ribossomal 16S. O total de 20 isolados foi identificado após ser verificada a atividade antimicrobiana dos extratos por eles produzidos.

Os isolados do gênero *Pseudoalteromonas* (Figura 12), ANT\_B6, ANT\_B44, ANT\_B46 e ANT\_B76, não foram identificados em nível de espécie, porém estão proximamente relacionadas às espécies *Pseudoalteromonas issachenkonii* KMM 3549 e *Pseudoalteromonas tetraodonis* KMM 3635. A espécie *P. tetraodonis* foi descrita em 1990 como *Alteromonas tetraodonis* (Simidu et al., 1990) e cinco anos depois foi reclassificadas como *Pseudoalteromonas haloplanktis* subsp. *tetraodonis* (Gauthier et al., 1995), porém no ano de 2002 foi novamente reclassificadas por Ivanova et al. (2002) como *P. tetraodonis*. A espécie *P. issachenkonii* foi descrita por Ivanova e colaboradores em 2002. De acordo com Ivanova, as duas espécies são muito semelhantes quanto a taxonomia molecular utilizando o RNAr 16S, formando um robusto clado, porém a diferenciação das duas espécies ocorre quando é realizada a hibridização DNA-DNA (Ivanova et al., 2002). Além disso, o gênero *Pseudoalteromonas* tem passado por grandes modificações e estruturação, já que muitas espécies do gênero *Alteromonas* foram reclassificadas passando a pertencer a esse novo gênero. O Isolado ANT\_B53 foi identificado como espécie *Pseudoalteromonas mariniglutinosa* KMM 3635.

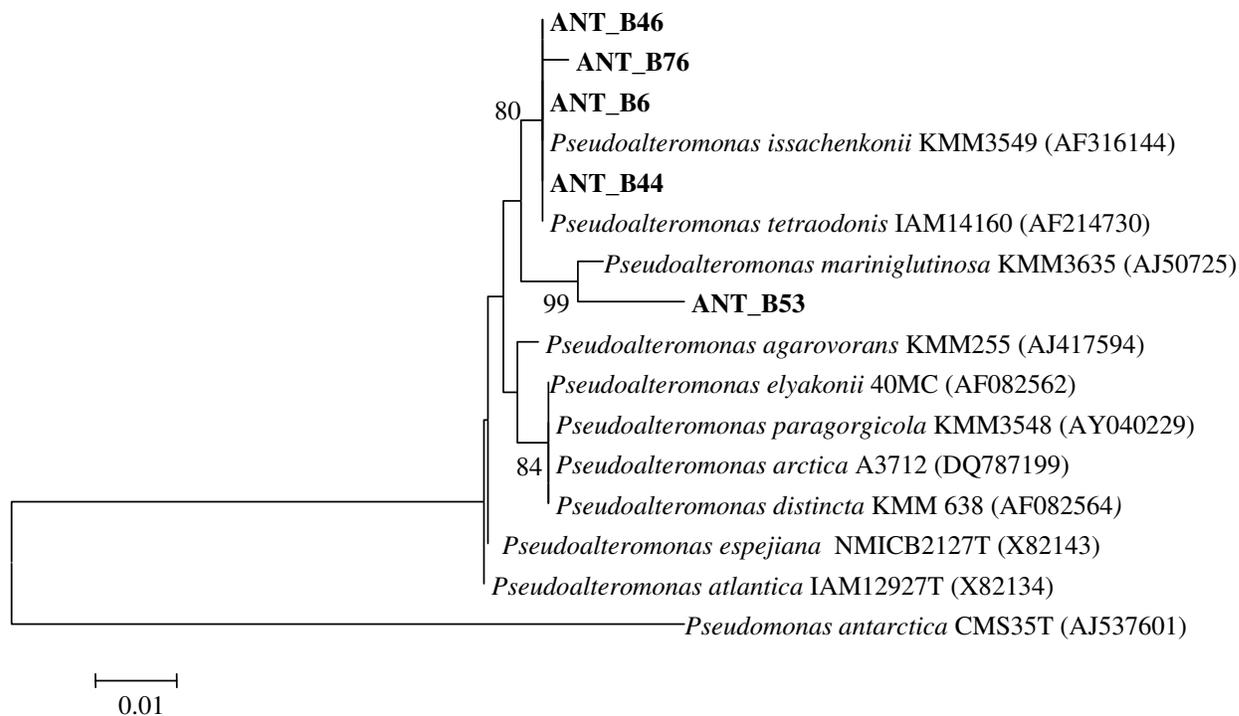


Figura 12. Árvore filogenética baseada em análise filogenética da sequência do gene RNA ribossomal 16S de bactérias pertencentes ao gênero *Pseudoalteromonas* isoladas da Antártica. Distâncias evolutivas baseadas no modelo de Kimura 2-p e construção da árvore pelo método Neigbor-Joining, com valores de *bootstrap* de 1000 repetições. *Pseudomonas antarctica* foi utilizada como *outgroup*.

A identificação dos isolados do gênero *Pseudomonas* (Figura 13) indicou que o isolado ANT\_B144 pode pertencer a uma das espécies *P. poae* e *P. trivialis*. As duas espécies foram descritas por Behrendt e colaboradores (2003) e ao analisar a sequência do RNAr 16S, as duas espécies foram agrupadas no mesmo clado. A principal forma de diferenciá-las é através de características fenotípicas. O isolado ANT\_B146 foi identificado como *Pseudomonas azotoformans* CUG 12536, e o isolado ANT\_B5 como *Pseudomonas segetis* FR 1439.

O isolado ANT\_B50, foi identificado como *Stenotrophomonas rhizophila* (Figura 14). O gênero *Stenotrophomonas* foi descrito em 1993 a partir da reclassificação de *Xanthomonas maltophilia* (Palleroni; Bradbury, 1993) e o gênero é composto de 13 espécies, na qual 11 delas foram descritas a partir do ano 2000 (Euzéby, 1997) e a hibridização DNA-DNA é a técnica que mostra diferenças representativas entre *S. rhizophila*, *S. maltophilia* e *S. nitritireducens* (Wolf et al., 2002).

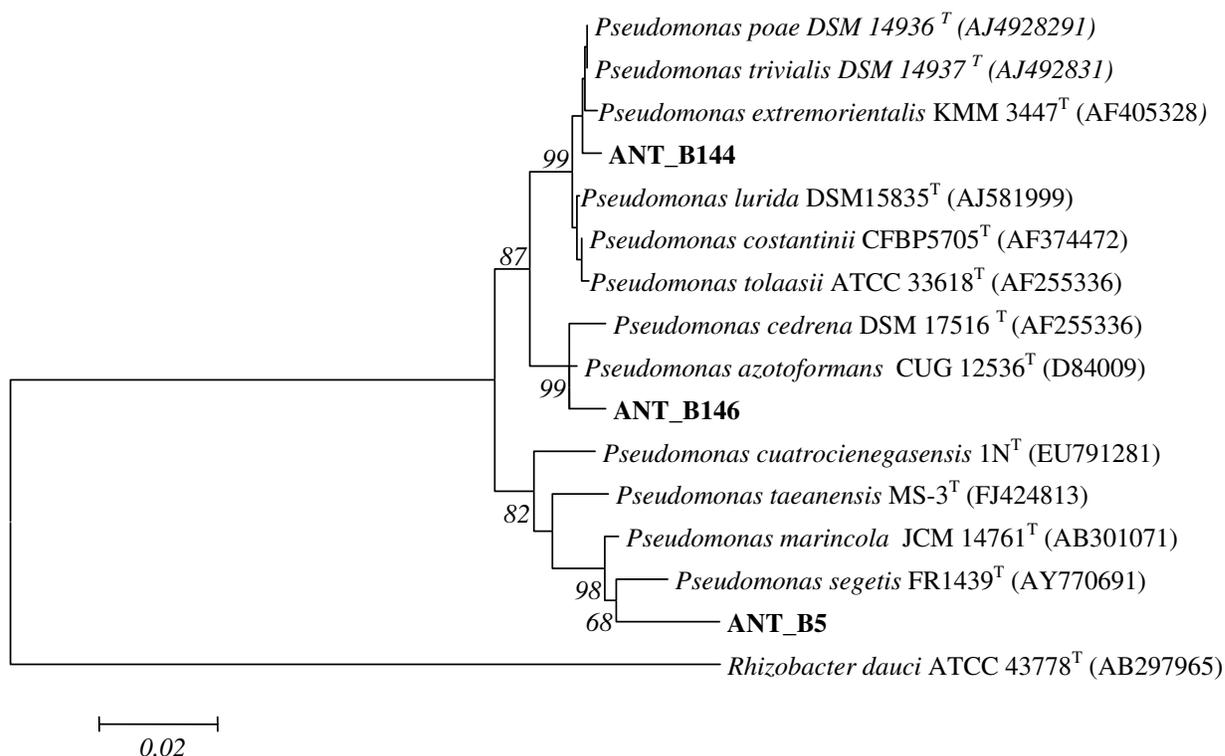


Figura 13. Árvore filogenética baseada em análise filogenética da sequência do gene RNA ribossomal 16S de bactérias pertencentes ao gênero *Pseudomonas* isoladas da Antártica. Distâncias evolutivas baseadas no modelo de Kimura 2-p e construção da árvore pelo método Neigbor-Joining, com valores de *bootstrap* de 1000 repetições. *Rhizobacter dauci* foi utilizada como *outgroup*.

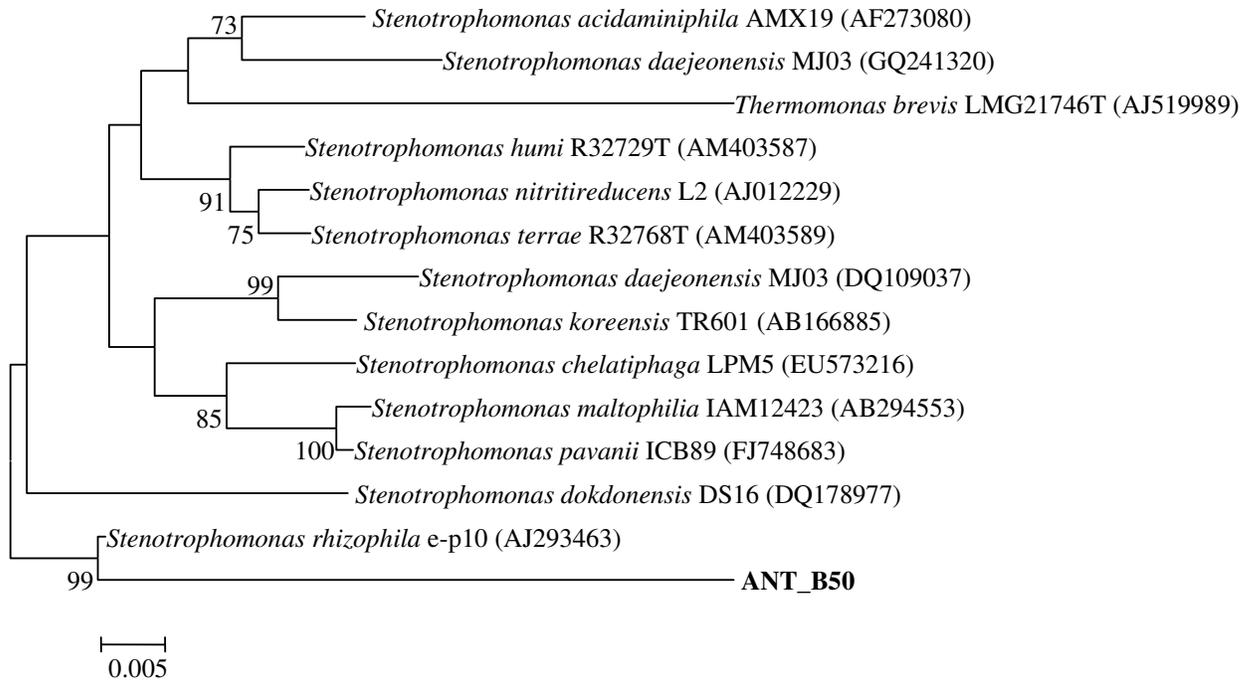


Figura 14. Árvore filogenética baseada em análise filogenética da sequência do gene RNA ribossomal 16S da bactéria pertencente ao gênero *Stenotrophomonas* isolado da Antártica. Distâncias evolutivas baseadas no modelo de Kimura 2-p e construção da árvore pelo método Neigbor-Joining, com valores de *bootstrap* de 1000 repetições. *Thermomonas brevis* foi utilizada como *outgroup*.

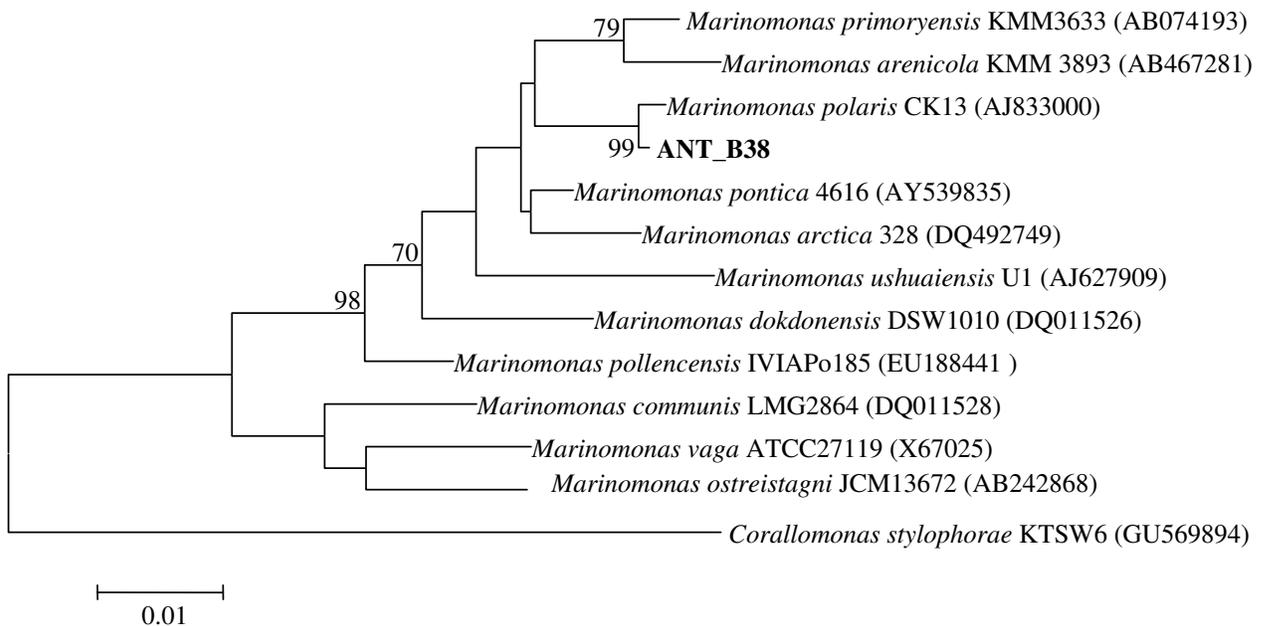


Figura 15. Árvore filogenética baseada em análise filogenética da sequência do gene RNA ribossomal 16S da bactérias pertencentes ao gênero *Marinomonas* isoladas da Antártica. Distâncias evolutivas baseadas no modelo de Kimura 2-p e construção da árvore pelo método Neigbor-Joining, com valores de *bootstrap* de 1000 repetições. *Corallomonas stylophorae* foi utilizado como *outgroup*.

O isolado ANT\_B38 foi identificado como *Marinomonas polaris* (Figura 15), espécie descrita por Gupta e colaboradores em 2006, é uma espécie psicrohalotolerante, isolada pela primeira vez da ilha subantártica Kerguelen (Gupta et al., 2006).

Quanto ao Filo Actinobacteria, foram identificadas dois isolados (ANT\_B128 e ANT\_B131) do gênero *Streptomyces*, e não foi possível realizar a diferenciação da espécie (Figura 16). Para Goodfellow e colaboradores (2008) a análise do gene rRNA 16S pelo método de Neighbor-Joining mostrou que os membros do clado apresentam semelhanças de 97,8-100 %, e que o gene não é suficiente para permitir a diferenciação das espécies. É necessário unir informações de um estudo de taxonomia polifásica, que pode incluir a análise da sequência do gene *rpoB*, para realizar a diferenciação das espécies. Ao avaliar as colônias dos isolados ANT\_B128 e ANT\_B131, características de coloração do ANT\_B128 era verde e marrom, enquanto do isolado ANT\_B131 era branco e amarelo quando crescidos no meio ISP2/ASW. O isolado ANT\_B136 foi identificado como *Saccharopolyspora gregorii*, um gênero de organismos não-ácido-resistentes, aeróbicos que formam hifas amplamente ramificada no substrato e pode fragmentar-se em elementos em forma de bastonete e hifas aéreas (Qin et al., 2010).

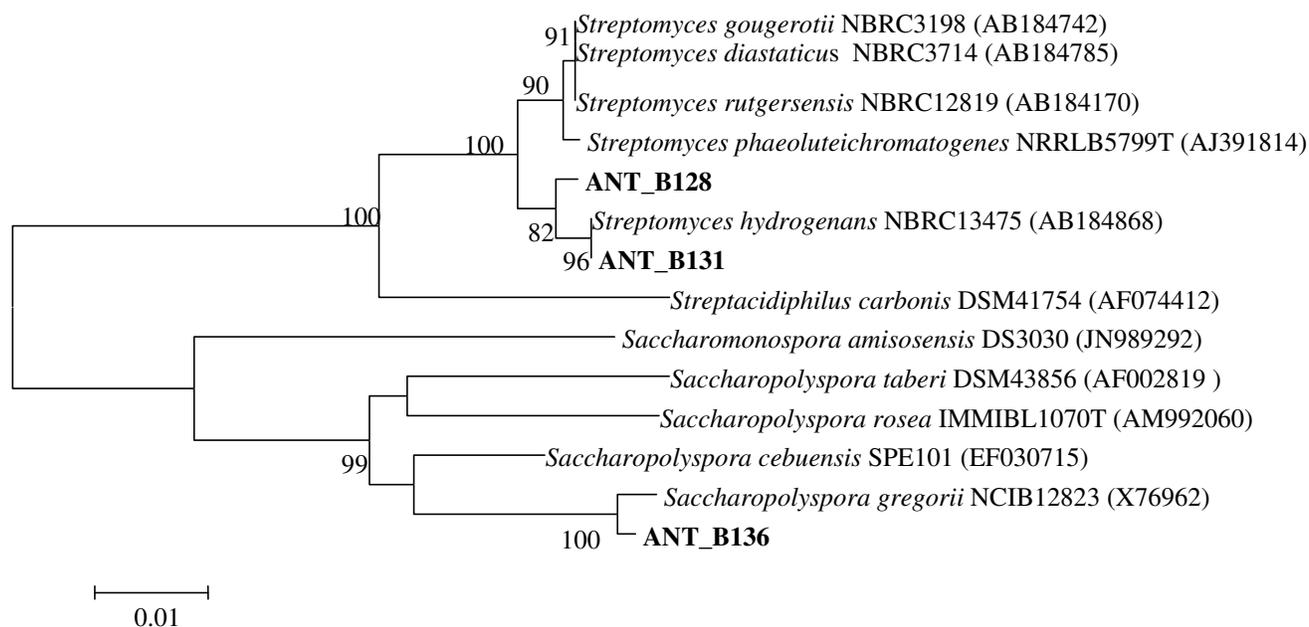


Figura 16. Árvore filogenética baseada em análise filogenética da sequência do gene RNA ribossomal 16S de bactérias pertencentes ao Filo Actinobacteria isoladas da Antártica. Distâncias evolutivas baseadas no modelo de Kimura 2-p e construção da árvore pelo método Neighbor-Joining, com valores de *bootstrap* de 1000 repetições. *Streptacidiphilus carbonis* foi utilizado como *outgroup*.

O isolado ANT\_B111, único representante do Filo Bacteroidetes a apresentar atividade antimicrobiana nesse estudo, foi identificado como *Algoriphagus aquimarinus* (Figura 17). Essas bactérias são heterotróficas Gram-negativas, não-móveis, estritamente aeróbias, sacarolíticas, tem cepas pigmentadas e são adaptadas ao frio. Essas bactérias foram isoladas de gelo do mar e das esteiras de cianobactérias em lago salinos da Antártida (Nedashkovskaya et al., 2005).

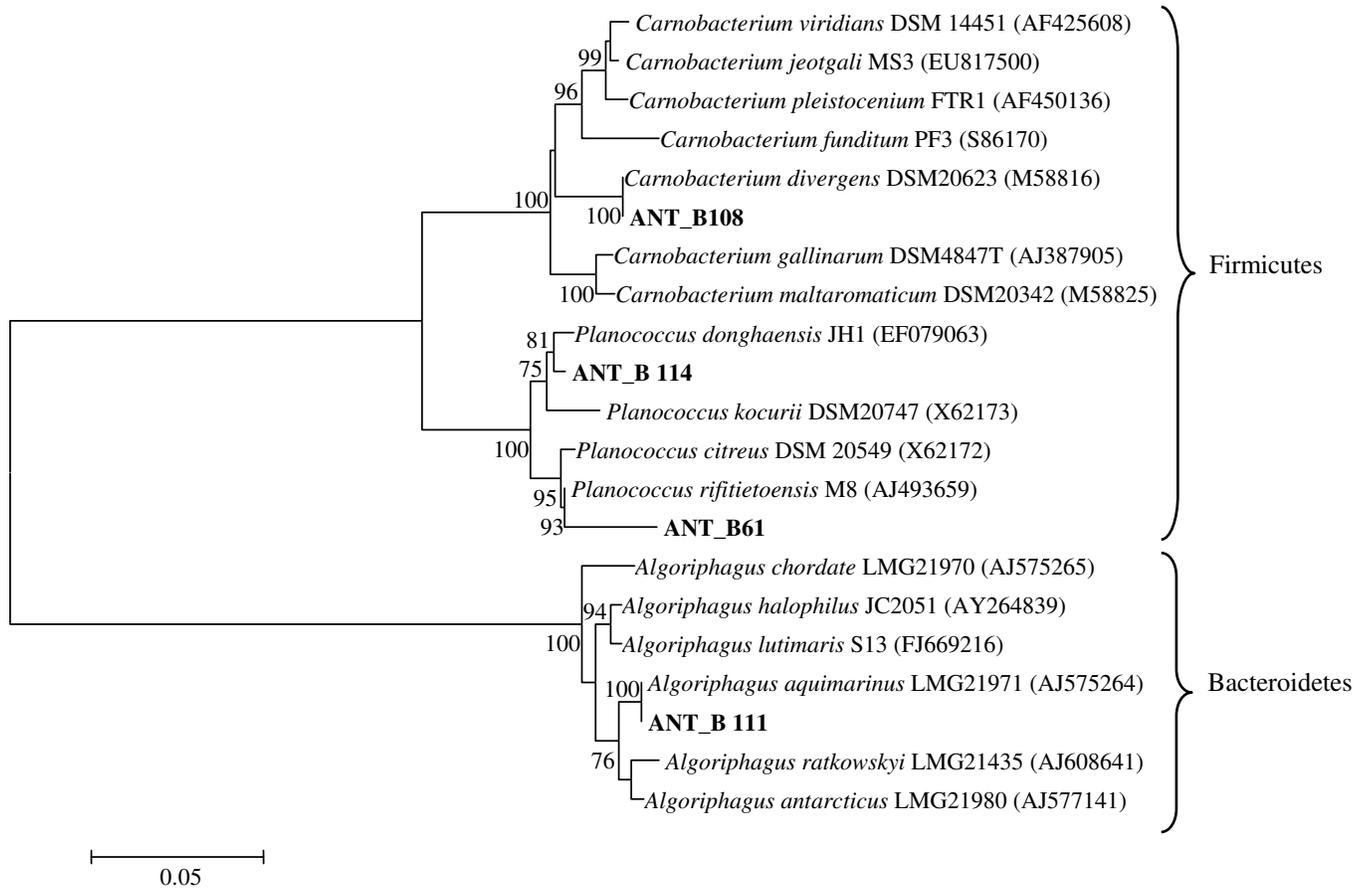


Figura 17. Árvore filogenética baseada em análise filogenética da sequência do gene RNA ribossomal 16S de bactérias pertencentes aos Filos Bacteroidetes e Firmicutes isoladas da Antártica. Distâncias evolutivas baseadas no modelo de Kimura 2-p e construção da árvore pelo método Neigbor-Joining, com valores de *bootstrap* de 1000 repetições.

O isolado ANT\_B108, foi identificado como *Carnobacterium divergens* (Figura 17), duas espécies desse mesmo gênero foram isoladas de água anóxica de lagos da Antártica, *Carnobacterium funditum* e *Carnobacterium alterfunditum* (Franzmann et al., 1991). Outros dois isolados que também pertencem ao Filo Firmicutes, foram identificados como *Planococcus rifitiensis*, isolado ANT\_B61, e *Planococcus donghaensis*, isolado ANT\_B114 (Figura 17). As espécies *P. antarcticus* e *P. psychrophilus* também são espécies do mesmo gênero que foram isoladas de lagoas da Antártica (Reddy et al. 2002).

Os isolados ANT\_B65 e ANT\_B105 foram mais relacionados a espécie *Marinilactibacillus piezotolerans* (Figura 18), entretanto, testes complementares devem ser realizados para identificação dos isolados. Até o presente, o gênero possui duas espécies descritas *M. psychrotolerans*, descrito por Ishikawa e colaboradores em 2003, e *M. piezotolerans*, descrito por Toffin et al. em 2005.

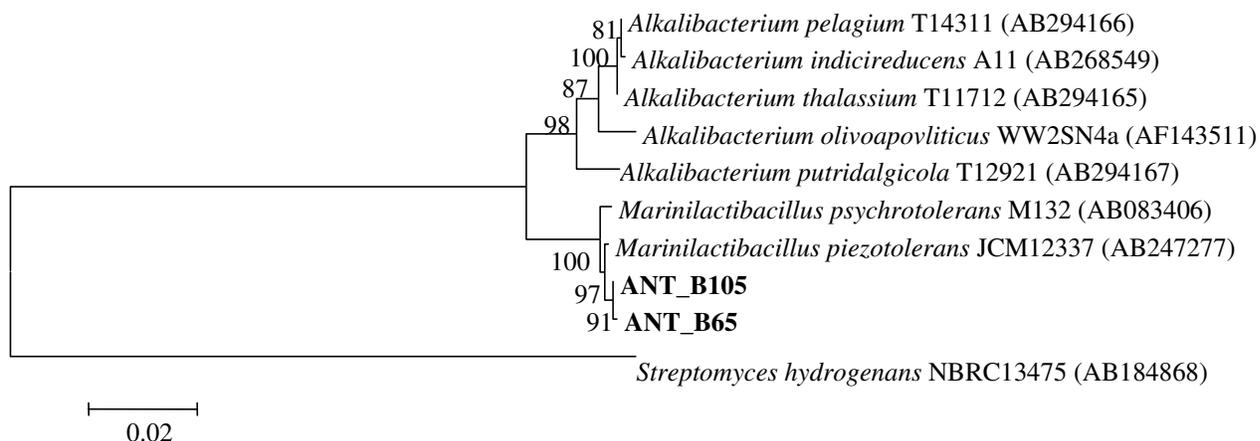


Figura 18. Árvore filogenética baseada em análise filogenética da sequência do gene RNA ribossomal 16S da bactéria pertencente ao Filo Firmicutes, gênero *Marinilactibacillus*, isolado da Antártica. Distâncias evolutivas baseadas no modelo de Kimura 2-p e construção da árvore pelo método Neighbor-Joining, com valores de bootstrap de 1000 repetições. *Streptomyces hydrogenans* foi utilizada como *outgroup*.

## 5.9. ANÁLISE DO PERFIL QUÍMICO DOS EXTRATOS BRUTOS COM ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

A obtenção da composição química dos diferentes extratos brutos avaliados foi possível pelo emprego da técnica de cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC-MS). O perfil químico dos diferentes extratos resultantes foi organizado e agrupado de acordo com o gênero científico de cada micro-organismo avaliado neste estudo, possibilitando assim uma comparação entre amostras similares entre si. O Anexo II indica os compostos identificados nessa etapa e em quais extratos brutos foram identificados. Além disso, houve a comparação do perfil químico obtido por cromatografia gasosa entre os extratos oriundos de um crescimento microbiano e um extrato considerado controle negativo, ou seja, aquele onde foi obtido o extrato do meio de cultivo esterilizado, sem o crescimento de nenhum micro-organismo.

A análise do extrato considerado o controle negativo, denominado N, resultou em três picos (Figura 19), que correspondem aos compostos: Pico 1: Pirrol[1,2-a]pirazina-1,4-diona,hexahidro (tempo de retenção: 37,131 min), Pico 2: Pirrol[1,2-a]pirazina-1,4-diona,hexahidro-3-(2-metilpropil) (tempo de retenção: 42,523 min), Pico 3: Pirrol[1,2-a]pirazina-1,4-diona,hexahidro-3-(fenilmetil)- (tempo de retenção: 56,443 min). Após o teste de microdiluição, foi observado que o extrato N não apresentava atividade antimicrobiana, dessa forma, os compostos indicados anteriormente não foram associados à atividade antimicrobiana, e nas análises dos extratos brutos obtidos das bactérias, foram desconsiderados como um possível composto antimicrobiano. Os picos de menor intensidade, presentes no cromatograma da Figura 19, não apresentaram uma boa fragmentação e conseqüentemente uma baixa porcentagem de similaridade com a biblioteca NIST/2005, o que não permitiu sua identificação. Os cromatogramas dos extratos brutos oriundos de meio de cultivo inoculado com bactéria foram comparados ao extrato bruto denominado N.

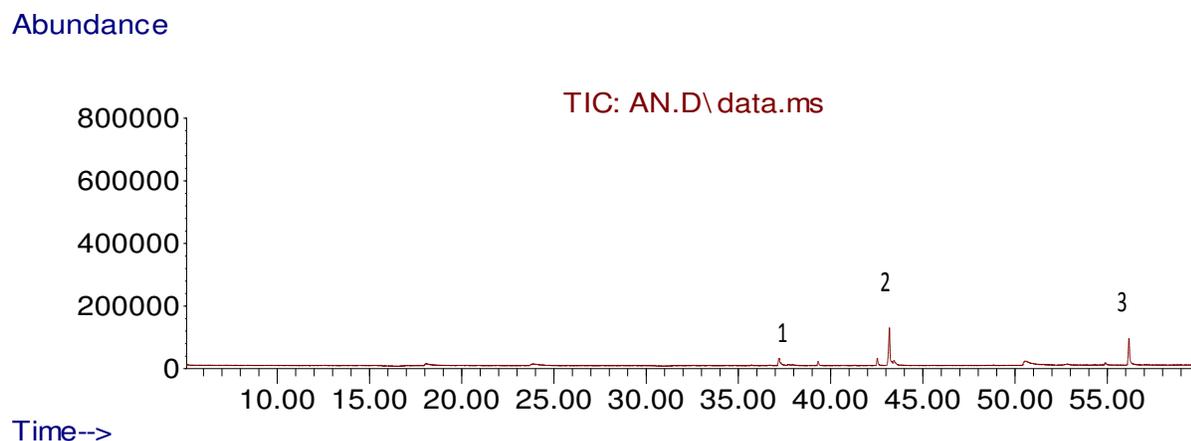


Figura 19. Cromatograma obtido por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas, obtido com extrato bruto denominado N, considerado controle negativo. Pico 1: Pirrol [1,2-a]pirazina-1,4-diona,hexahidro; Pico 2: Pirrol[1,2-a]pirazina-1,4-diona,hexahidro-3-(2-metilpropil); Pico 3: Pirrol [1,2-a]pirazina-1,4-diona,hexahidro-3-(fenilmetil).

Para os extratos brutos obtidos com bactérias do gênero *Pseudoalteromonas*, denominados E6, E44, E46, E53 e E76, os cromatogramas foram agrupados em dois grupos mais semelhantes para sua posterior comparação, o primeiro agrupamento foi dos extratos brutos denominados E6 e E46 (Figura 20), e o segundo agrupamento contemplou os extratos brutos denominados E44, E53 e E76 (Figura 21).

Todos os extratos brutos provenientes da cultivo de bactérias do gênero *Pseudoalteromonas* possuem o composto ácido n-hexadecanóico em sua composição. O extrato E6 apresentou quatro compostos idênticos ao E46 indicados pelos picos: pico 2, composto 13-metil-oxaciclotetradecano-2,11-dione, pico 3, ácido pentadecanóico, pico 5, ácido Z-7-hexadecanóico e pico 6, ácido n-hexadecanóico. O extrato E46 possui dois compostos que não estão presentes no extrato E6, que são: pico 8, ácido 9-hexadecanóico e pico 9, ácido 9-octadecanóico. Os compostos, ácido pentadecanóico, ácido hexadecanóico (ácido palmítico), ácido 9-octadecanóico (ácido oleico) são ácidos graxos saturados muito comuns em óleos vegetais (Agoramoorthy et al., 2007).

Os ácidos pentadecanóico, hexadecanóico e o ácido octadecanóico foram associados à atividade antibacteriana e antifúngica quando associados em um extrato obtido do mangue (*Excoecaria agallocha*) (Agoramoorthy et al., 2007). O ácido

hexadecanóico e o ácido 9-octadecanóico correspondem a 59% dos compostos voláteis do óleo essencial da planta *Aquilaria sinensis*, que apresentou atividade antimicrobiana contra as bactérias *S. aureus*, *B. subtilis* (Chen et al, 2011). Choi e colaboradores (2013) avaliaram a atividade antimicrobiana de ácidos graxos saturados e insaturados sobre patógenos causadores de cáries, estomatites, gengivites e periodontites. Os compostos associados à atividade inibitória dos micro-organismos foram o ácido hexadecanóico, o ácido octadecanóico e o ácido linoleico.

Os ácidos hexadecanóico e octadecanóico apresentaram ação antimicrobiana contra *S. aureus*, *E. coli* e *Salmonella* sp., com valores de MIC que variam de 20 a 0,625 mg.mL<sup>-1</sup> o que corrobora com os resultados deste estudo (Zhong-hui et al.,2010).

Outras aplicações desses ácidos incluem o uso como inseticida, fungicida, herbicida e antimicrobiano, já que o ácido octadecanóico está registrado na lista D de pesticidas (EPA, 1998). O ácido hexadecanóico é aplicado como aditivo em alimentos aprovado pelo FDA (USFDA, 2008).

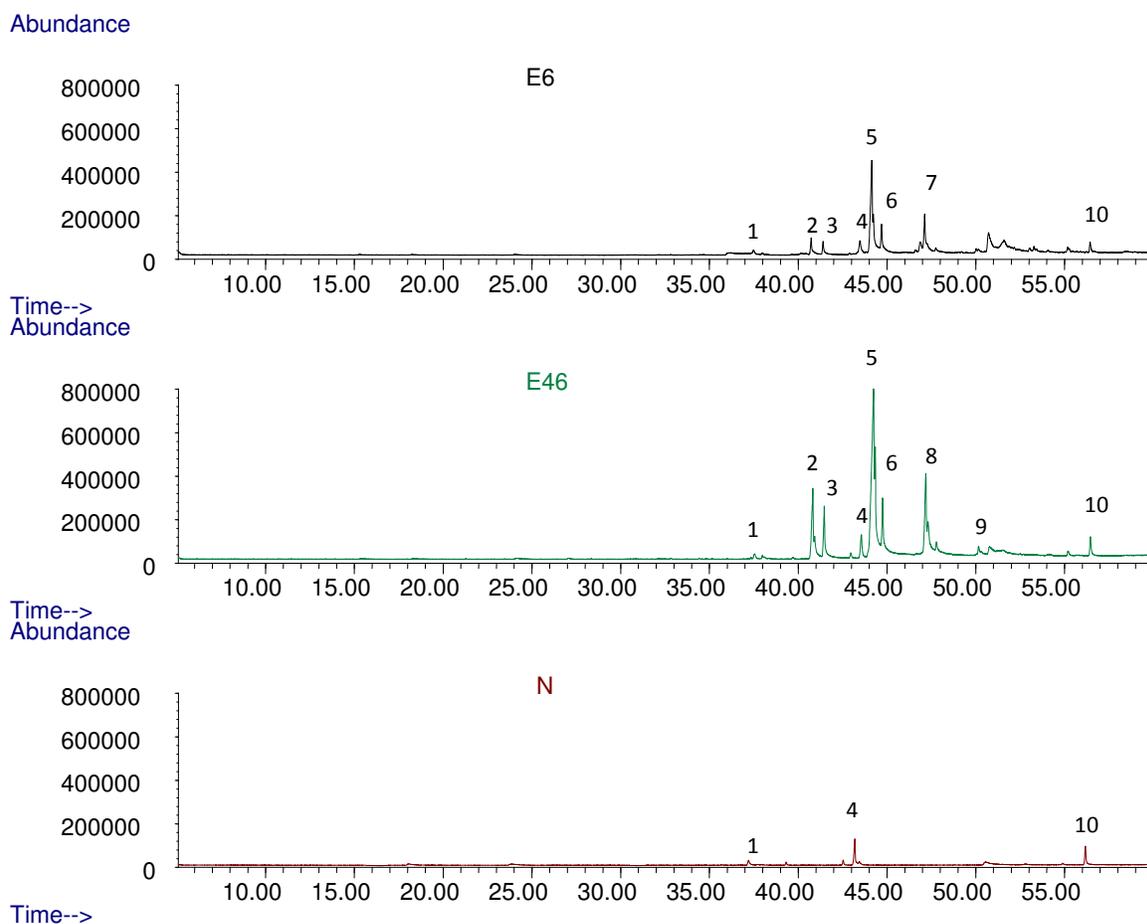


Figura 20. Cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massas dos extratos brutos denominados E6, E46, obtidos do gênero *Pseudoalteromonas*, e N. Pico 1- Pirrol[1,2-a]pirazina-1,4-diona,hexahidro; Pico 2- 13-metil-oxaciclotetradecano-2,11-diona; Pico 3- Ácido pentadecanóico; Pico 4- Pirrol[1,2-a]pirazina-1,4-diona, hexahidro-3-(2-metilpropil); Pico 5- Ácido Z-7-hexadecanóico; Pico 6- Ácido n-hexadecanóico; Pico 7- Ácido pentadecanóico; Pico 8- Ácido 9-hexadecanóico; Pico 9- Ácido oléico; Pico 10- Pirrol[1,2-a]pirazine-1,4-diona, hexahidro-3-(fenilmetil).

Para o segundo grupo de extratos brutos obtidos de isolados do gênero *Pseudoalteromonas* (Figura 21) foram observados compostos comuns entre os extratos brutos do grupo, porém cada extrato apresentou alguns compostos específicos. Tal especificidade pode ser avaliada nos resultados de MIC obtidos nos testes de microdiluição contra os micro-organismos padrão da CLSI (Tabela 5) e na avaliação de MIC dos extratos brutos contra as linhagens de *Neisseria meningitides* (Tabela 7).

O extrato bruto denominado E53 foi o único a inibir apenas *M. luteus*, os extratos brutos denominados E44 e E76 apresentaram atividade antibacteriana contra *S. aureus*, *B. subtilis*, *M. luteus* e *E. coli*, e apenas o extrato bruto E44 apresentou atividade bactericida frente a três indicadores. Ao ser testado frente as linhagens de *N. meningitidis*, E76 se sobressaiu em comparação ao E53, que não inibiu nenhuma linhagem avaliada. O extrato bruto denominado E44 não foi avaliado nesse experimento.

A diferença nos resultados obtidos da atividade antibacteriana pode ser justificada pela composição distinta dos extratos. O extrato bruto denominado E44 apresentou três compostos distintos, sendo os picos 3, 6 e 7 do cromatograma da Figura 21. O composto 2H-indol-2-one-1,3-dihidro, (pico 3, Figura 21) possui similaridade com compostos descrito em literatura científica, cuja indicação terapêutica é variada, incluindo ação antimicrobiana, antituberculose, anti HIV e anticonvulsivante (Akhaja; Raval, 2011). O composto ácido hexadecanóico e suas variações, pico 6 e pico 7, possuem atividade antimicrobiana conhecida, como descritos anteriormente.

O extrato bruto denominado E53, obtido do meio fermentativo com a espécie *P. mariniglutinosa*, possuiu como diferencial o composto 2,4- imidazolidinadiona,5-metil-, (pico 1, Figura 21). Estudos de Niku-Paavola e colaboradores (1999), mostraram que esse composto estava presente em extrato bruto obtido do meio fermentativo com a bactéria *Lactobacillus plantarum* e foi associado à atividade antimicrobiana. O composto do pico 8, proveniente do extrato bruto denominado E53, gerou um fragmentograma que, pela técnica utilizada, não pôde ser identificado, pode se tratar de um composto que não está descrito na Biblioteca NIST/2005. O composto Fenol-2,4-bis(1-metil-1-feniletil), pico 10, não foi identificado como um composto cuja atividade antimicrobiana não foi relatada na revisão realizada na literatura.

O extrato bruto denominado E76, cujo MIC contra linhagens de *N. meningitidis* apresentou melhores concentrações em comparação aos outros extratos, possui como diferencial os compostos indicados pelos picos 1, 2,4- imidazolidinadiona,5-metil-, pico 2, 3-piridinacarboxamida, pico 6, ácido Z-11-hexadecanóico e pico 8, não identificado (Figura 21). Os compostos identificados nos picos 1 e 6 já foram discutidos anteriormente, e possuem atividade antimicrobiana associada à eles. O composto 3-piridinacarboxamida (Pico 2) também é um composto solúvel da vitamina B3 que possui atividade antimicrobiana contra *Mycobacterium tuberculosis*, *Leishmania*, *Plasmodium*, *Trypanossoma cruzi*, *Trypanossoma brucei* e HIV, cujo mecanismo de ação ainda não foi elucidado (Unceti-Broceta et al., 2013).

São conhecidas moléculas bioativas produzidas por bactérias do gênero *Pseudoalteromonas* sp. CF6-2 isoladas do fundo do mar, e que produzem novas moléculas com potencial de se tornarem antimicrobianos. Pseudoalterina é uma nova protease M23 secretada por essas bactérias, que atua diretamente na camada de peptídeoglicano da parede celular das bactérias (Zhao et al., 2014). Romoli e colaboradores (2014) identificaram a atividade antimicrobiana de compostos voláteis obtidos pela bactéria *Pseudoalteromonas* sp. TB41, isolada de uma esponja na Antártica. A atividade contra *Burkholderia cepacia* foi associada a mais de 30 compostos voláteis obtidos e identificados pela técnica de GC-MS.

Quanto aos extratos obtidos de isolados do gênero *Pseudomonas*, denominados E5, E144 e E146, foi observado um total de 14 compostos (Figura 22) que podem estar associados à atividade antibacteriana dos extratos.

Foram observados compostos comuns entre os extratos, indicados pelos picos 3 e 11, porém cada extrato apresentou uma composição final diferenciada. Tal diferença também é observada nos resultados do MIC (Tabela 5), onde E5 apresentou atividade bacteriostática apenas contra *M. luteus*, inibição que não foi observada em E144 e E146. Essa diferença pode estar associada ao composto identificado no pico 12 (Figura 22), que assim como os picos 13 (E144) e pico 14 (E146), não apresentaram boa fragmentação, o que inviabilizou sua identificação pela análise em GC-MS.

Os extratos brutos denominados E144 e E146 apresentaram atividade contra *S. aureus* e *B. subtilis*, cujos valores de MIC foram mais promissores para o extrato E146 (Tabela 5). Na avaliação contra *N. meningitidis* (Tabela 7) E146 se destacou frente a todos os extratos contra as linhagens B4, C2135 e YUSA. Quanto ao composto do pico 3 (Figura 22), 2,4-imidazolidinadiona,5-metil-, pico 8, ácido Z-11-hexadecanóico, pico 9, ácido n-hexadecanóico, e pico 17, fenol-2,4-bis(1-metil-1-feniletil).

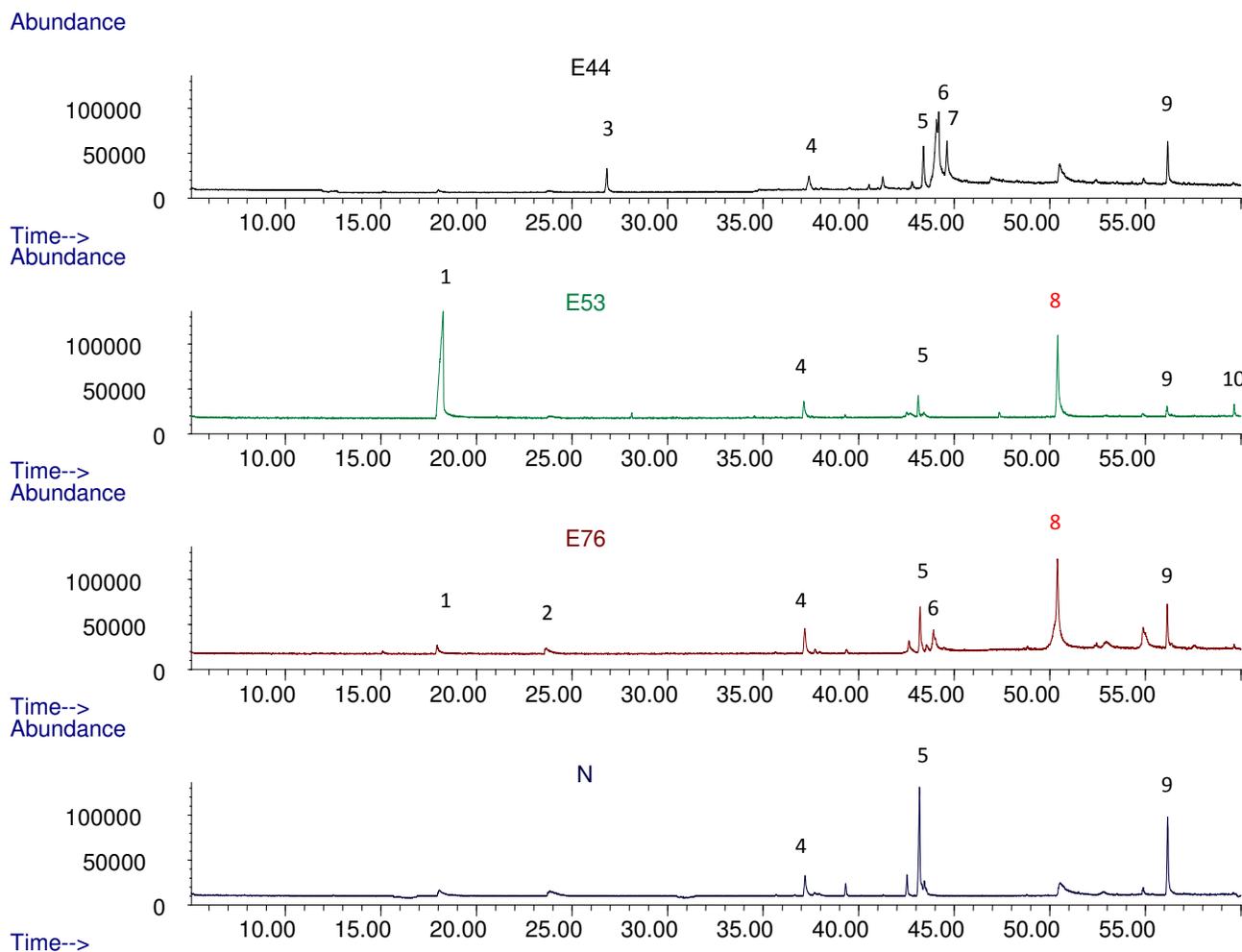


Figura 21. Cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massas dos extratos brutos denominados E44, E53, E76, obtidos do gênero *Pseudoalteromonas*, e N. Pico 1- 2,4-imidazolidinadiona,5-metil-, Pico 2- 3-piridinacarboxamida, Pico 3- 2H-indol-2-one-1,3-dihidro, Pico 4- Pirrol[1,2-a]pirazina-1,4-diona, hexahidro, Pico 5- Pirrol[1,2-a]pirazina-1,4-dione,hexahidro-3-(2-metilpropil), Pico 6- ácido Z-11-hexadecanóico, Pico 7- ácido n-hexadecanóico, Pico 8 – Não identificado, Pico 9- Pirrol[1,2-a]pirazina-1,4-diona,hexahidro-3-(fenilmetil), Pico 10- fenol-2,4-bis(1-metil-1-feniletil)

Os picos 1 (Figura 22), presente em E144 e E146, denominado 2-aminofenol, é utilizado como ligante de complexos organometálicos onde foi observada atividade antibacteriana e antifúngica (Hossain et al, 2004). No levantamento realizado através da literatura científica, não foi encontrado registro de atividade antimicrobiana para o composto do pico 2, cujo nome químico é etanol,2-(2-butoxoetoxi)-, presente em E144 e E146, e os compostos de E144, pico 5, ácido ftálico, isobutil octilester, pico 10, enxofre octaatómico e pico 15, benzenamina,4,4'-(1,2-etenedil)bis-.

O extrato bruto denominado E146, foram identificados dois compostos distintos indicados pelos picos 6 e 11. O composto identificado no pico 6 corresponde ao ácido 1,2-benzenedicarboxílico(2-etilhexil)éster que é usado industrialmente para dar resiliência e resistência aos plásticos. Como molécula bioativa, promove a migração de carcinomas (Yao et al., 2012). O composto do pico 11, 1,4-benzenodiamina,N-(1-metiletil)-N-fenil, possui atividade antioxidante e antimicrobiana quando associado à fitocomponentes do extrato etanólico de *Polygonum chinense* (Ezhilan; Neelamegan, 2012).

O extrato denominado E50, obtido através do cultivo da bactéria *Stenotrophomonas rhizophila*, apresentou atividade bacteriostática contra *S. aureus*, *M. luteus*, *E.coli* e *B. subtilis*. A análise do extrato (Figura 23) mostrou compostos descritos anteriormente como bioativos com atividade antimicrobiana, são estes compostos indicados pelo pico 2, ácido pentadecanóico, pico 4, ácido Z-11-hexadecanóico, pico 5, ácido n-hexadecanóico. O composto do pico 6, 1-hexadecanol, é um álcool de longa cadeia, cuja atividade antimicrobiana foi demonstrada contra *S. aureus* (Togashi et al., 2007). O composto identificado como pico 7, ácido Z-11-tetradecenóico, ou ácido mirístico, é um ácido graxo saturado, assim como os outros constituintes do extrato, e sua atividade antibacteriana e antifúngica foi descrita anteriormente por Agoramoorthy e colaboradores (2007).

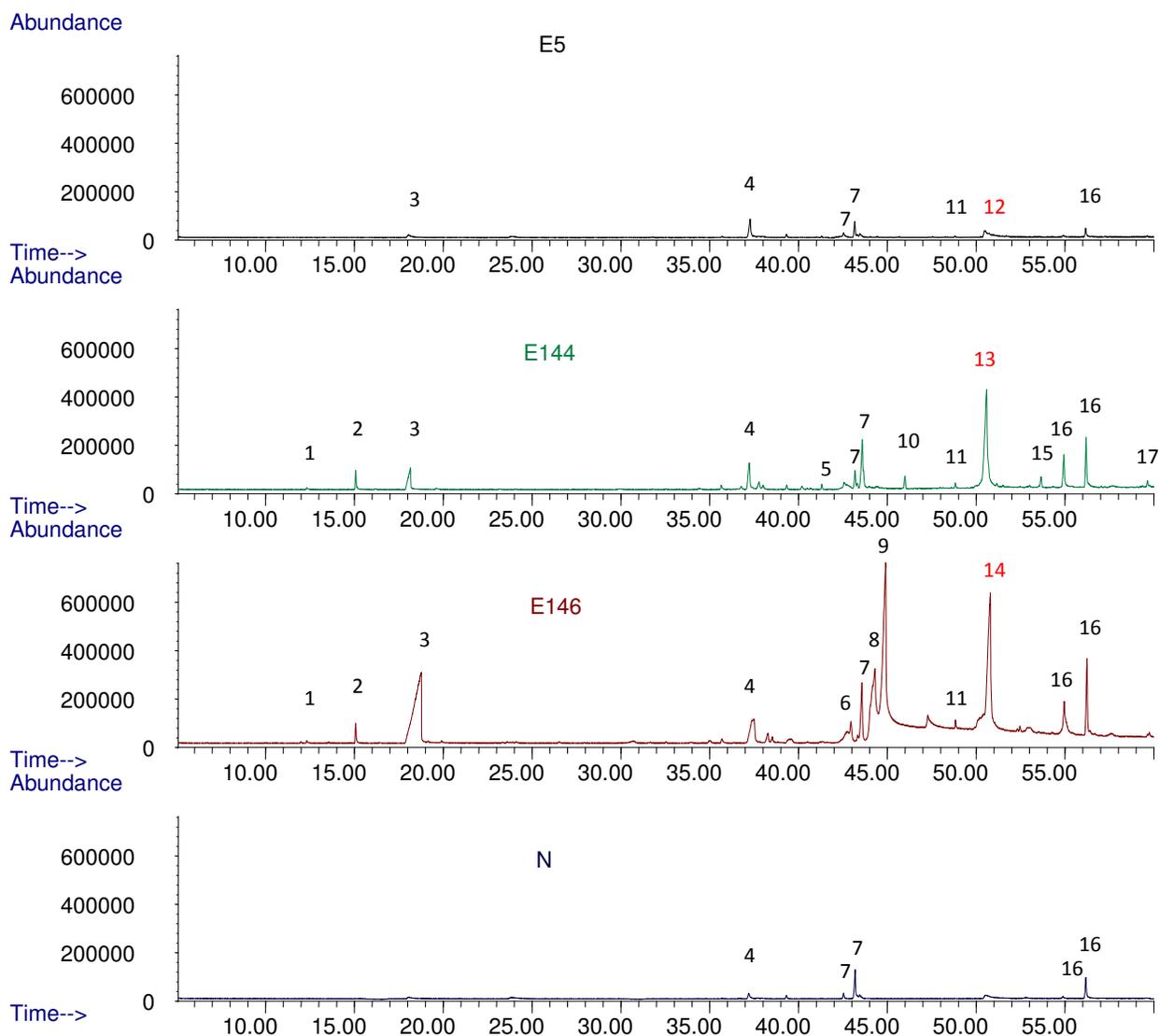
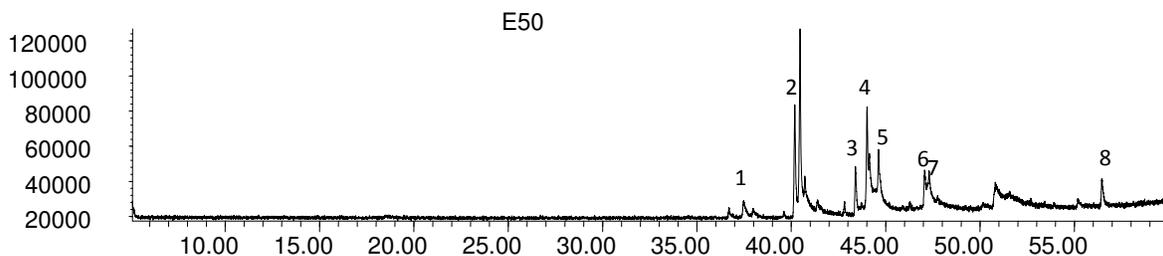
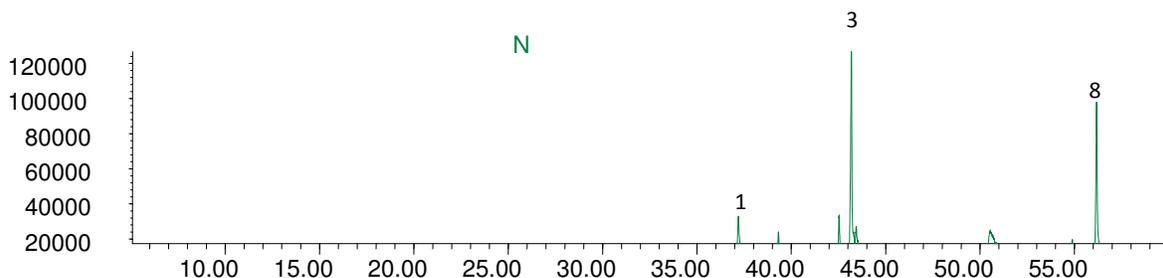


Figura 22. Cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massas dos extratos brutos denominados E5, E144, E146, obtidos do gênero *Pseudomonas*, e N. Pico 1- 2-aminofenol, Pico 2- Etanol,2-(2-butoxi)éster, Pico 3- 2,4-imidazolidinadiona,5-metil-, Pico 4- Pirrol[1,2-a]pirazina-1,4-diona,hexahidro-, Pico 5- ácido ftálico,isobutil octiléster, Pico 6- ácido 1,2-benzenedicarboxílico mono(2-etilhexil)éster, Pico 7- Pirrol[1,2-a]pirazina-1,4-diona, hexahidro-3-(2-metilpropil), Pico 8- ácido Z-11-hexadecanóico, Pico 9- ácido n-hexadecanóico, Pico 10- enxofre octaátômico cíclico, Pico 11- 1,4-benzenodiamina,N-(1-metiletil)-N'-fenil, Pico 12- Não identificado, 13- Não identificado, 14- Não identificado, Pico 15- benzenamina,4,4'-(1,2-etenodil)bis-, Pico 16- Pirrol[1,2-a]pirazina-1,4-diona,hexahidro-3-(fenilmetil), Pico 17- fenol-2,4-bis(1-metil-1-feniletil).

Abundance



Time-->  
Abundance



Time-->

Figura 23. Cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massas dos extratos brutos denominados E50, obtido da espécie *Stenotrophomonas rhizophila*, e N. Pico 1- Pirrol[1,2-a]pirazina-1,4-diona, hexahidro-; Pico 2- ácido pentadecanóico; Pico 3- Pirrol[1,2-a]pirazina-1,4-diona, hexahidro-3-(2-metilpropil); Pico 4- ácido Z-11-hexadecanóico; Pico 5- ácido n-hexadecanóico; Pico 6- 1-hexadecanol; Pico 7- ácido Z-11-tetradecanóico; Pico 8- Pirrol[1,2-a]pirazina-1,4-diona, hexahidro-3-(fenilmetil).

Obtido do meio fermentativo com a bactéria *Marinomonas polaris*, o extrato bruto denominado E38 apresentou atividade bacteriostática frente *S. aureus*, *B. subtilis* e a linhagem B4 de *N. meningitides*. A composição do extrato (Figura 24) indicou compostos cuja atividade antimicrobiana foi descrita e abordada anteriormente, são estes o pico 1, a 2,4-imidazolidinadiona,5-metil-; pico 2, 3-piridinacarboxamida, pico 6, ácido pentadecanóico, pico 8, ácido 9-hexadecanóico; pico 9, ácido n-hexadecanóico, pico 10, ácido 14-pentadecanóico; pico 12, ácido octadecanóico. No levantamento realizado através da literatura científica, não foi encontrado registro de atividade antimicrobiana para o composto 1H-indol,2,3-dihidro-4-metil- (Pico 3, Figura 24). Dongfei e colaboradores (2002) avaliaram que a oxaciclotetradecan-2-ona (pico 5) foi o composto majoritário do extrato obtido do fungo *Dictyophora echinovolvata* que apresentou atividade

antimicrobiana. O composto do pico 11, o ácido heptadecanóico, um ácido graxo insaturado teve a atividade antimicrobiana descrita anteriormente por Agoramoorthy e colaboradores (2007).

A marinocina é uma proteína antimicrobiana produzida pela espécie *Marinomonas mediterranea*, é detectada nos sobrenadantes do meio de cultura e apresenta notável resistência contra muitas enzimas hidrolíticas. Esse composto possui atividade bactericida contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. (Lucas-Elío et al., 2006).

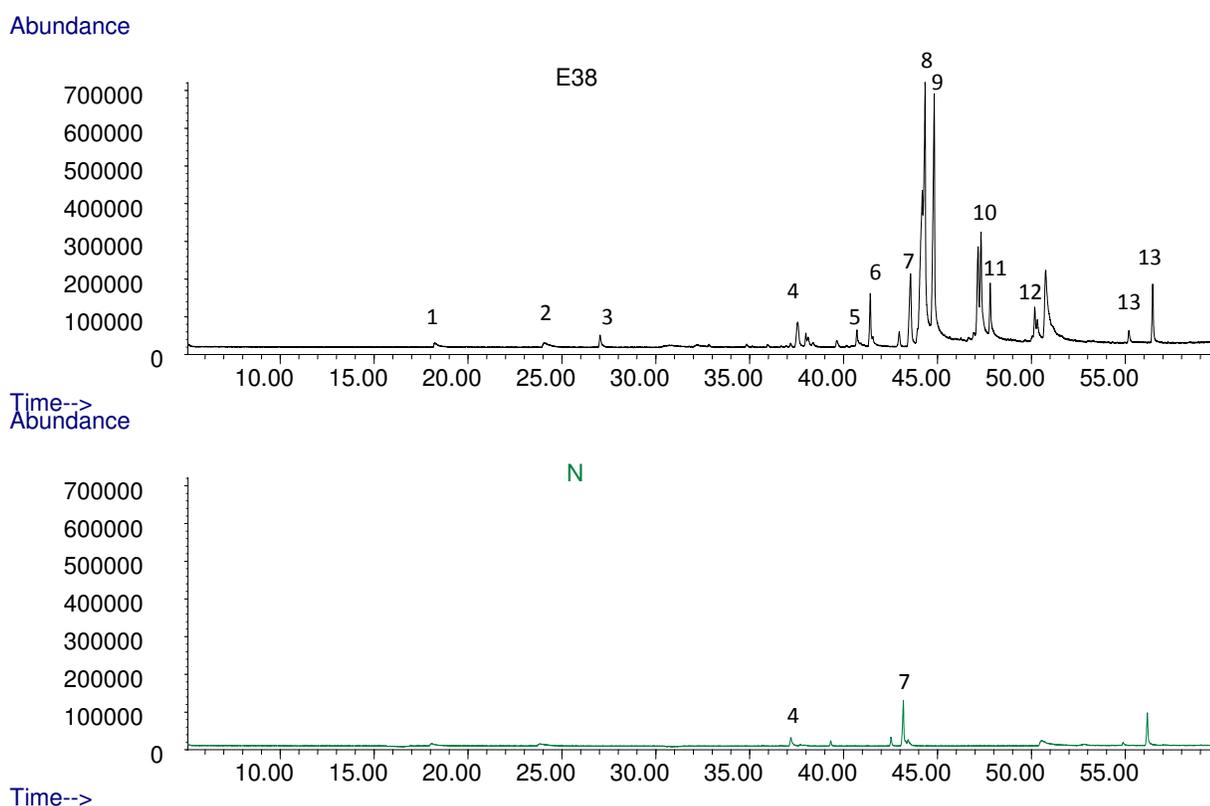


Figura 24. Cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massas dos extratos brutos denominados E38, obtido da espécie *Marinomonas polaris*, e N. Pico 1- 2,4- imidazolidinadiona, 5-metil-; Pico 2- 3-piridinacarboxamida; Pico 3- 1H-indol,2,3-dihidro-4-metil-; Pico 4- Pirrol[1,2-a]pirazina-1,4-diona,hexahidro-; Pico 5- Oxaciclote-tradecano-2-ona; Pico 6- ácido pentadecanóico; Pico 7- Pirrol[1,2-a]pirazina-1,4-diona,hexahidro-3-(2-metilpropil); Pico 8- ácido 9-hexadecanóico; Pico 9- ácido n-hexadecanóico; Pico 10- ácido 14-pentadecanóico; Pico ácido 11- heptadecanóico; Pico 12- ácido octadecanóico; 13- Pirrol[1,2-a]pirazina-1,4-diona, hexahidro-3-(fenilmetil).

Para os extratos obtidos através do cultivo de bactérias do gênero *Streptomyces* foram obtidos um total de 14 compostos (Figura 25). Na avaliação da Concentração Inibitória Mínima desses extratos, o extrato denominado E131 se destacou ao ser o único extrato a inibir *C. albicans* (Tabela 4). Alguns compostos, identificados no extrato bruto E131, foram destacados anteriormente por estarem relacionados à atividade antimicrobiana. Estes compostos estão indicados pelos picos: pico 1, 2,4-imidazolidinadiona,5-metil-, pico 5, ácido tetradecanóico, pico 7, ácido pentadecanóico; pico 9, ácido Z-11-hexadecanóico, pico 10- ácido n-hexadecanóico; pico 11- 1,4-Benzenodiamina,N-(1-metiletil)-N'-fenil; Os compostos dos picos 12 e 13 não apresentaram boa fragmentação o que inviabilizou sua identificação pela análise em GC-MS.

O composto identificado como trans-1,10-dimetil-tras-9-decalinol- (pico 2), conhecido como geosmina, é um composto orgânico volátil que confere o odor de terra (Wang et al., 2013). Estudos observaram que o geosmina associado ao composto 2-metilisoborneol((1-R-exo)-1,2,7,7-tetrametil-biciclo-(2,2,1)-heptan-2-ol) apresentaram atividade antimicrobiana contra cepas de *Salmonella* sp. (Nakajima et al., 1996; Dionigi et al., 1993). Através do levantamento realizado em literatura, não foi identificada correlação de atividade antimicrobiana associada aos compostos do Pico 3, Benzeno,1-(5,5-dimetil-1-ciclopenteno-1-il)-2-metoxi-, e do Pico 4, 1-Cicloheptano-1,4-dimetil-3-(2-metil-1-propene-1-il)-4-vinil-.

O gênero *Streptomyces* possui grande importância na produção de compostos bioativos naturais, incluindo antibióticos, pesticidas, herbicidas, e outras substâncias farmacologicamente ativas, como antitumorais e anti-imunossupressores. A estreptomicina é o primeiro antibiótico aminoglicosídeo descoberto, e foi utilizado com sucesso no tratamento da tuberculose. É um importante antibiótico de uso clínico que foi isolado da espécie *S. griseus* (Ohnishi et al., 2008). Estima-se que o total de compostos antimicrobianos que esse gênero é capaz de produzir, esteja na ordem de 100 mil substâncias sendo que apenas uma pequena fração disso foi revelada até agora (Watve et al., 2001).

*Streptomyces griseus* NTK 97, foi isolado a partir de uma amostra terrestre de Terra Nova Bay em Edmundson Point da Antártica. Essa espécie produz o composto denominado

frigociclinona. Este composto é um novo antibiótico com atividade inibitória contra as bactérias Gram-positivas, *Bacillus subtilis* DSM 10 e *Staphylococcus aureus* DSM 20231, com valores de MIC de 10 e 33  $\mu\text{M}$ , respectivamente (Bruntner et al., 2005)

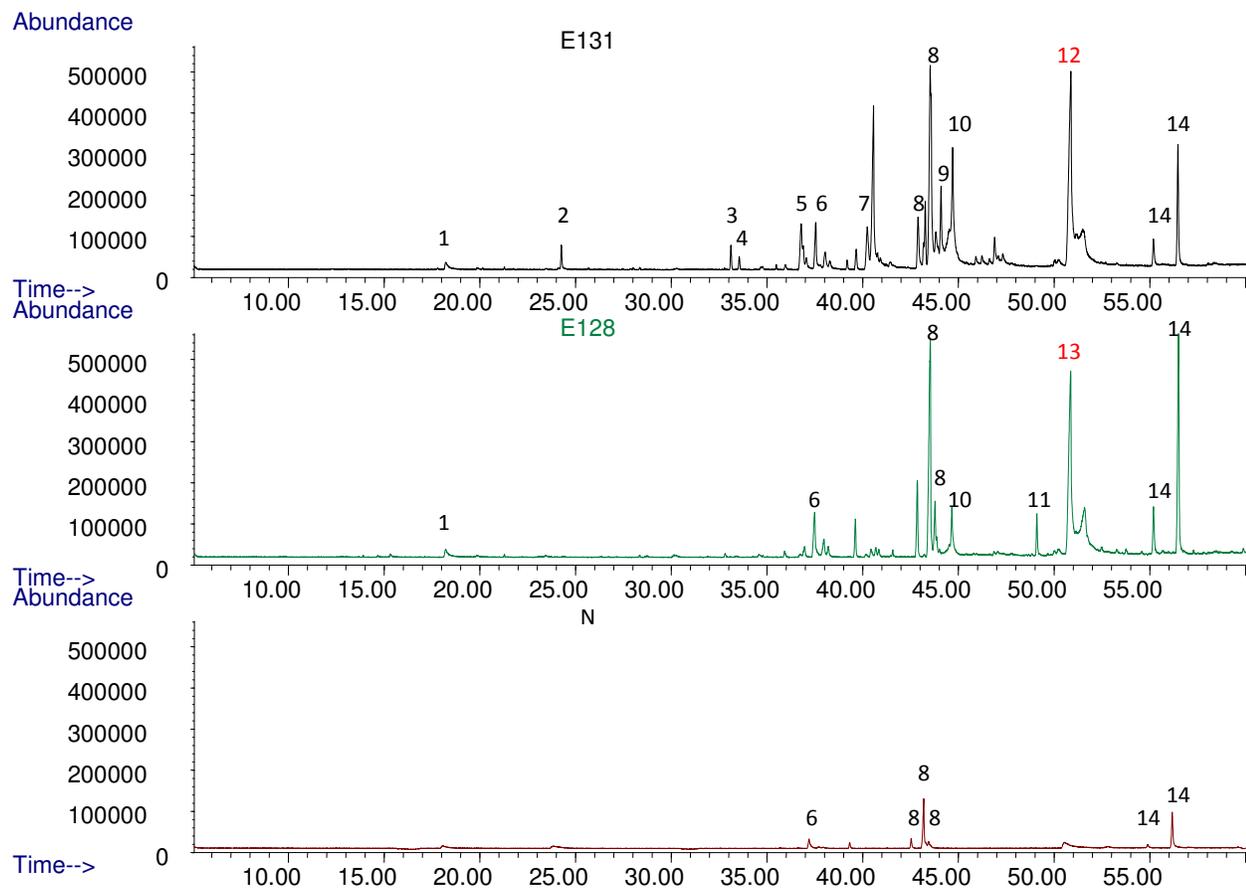


Figura 25. Cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massas dos extratos brutos denominados E128, E131, obtidas do gênero *Streptomyces*, e N. Pico 1- 2,4- Imidazolidinadiona,5-metil-; Pico 2- Trans-1,10-dimetil-tras-9-decalinol-; Pico 3- Benzene,1-(5,5-dimetil-1-ciclopenteno-1-il)-2-metoxi-; Pico 4- 1-Ciclohepteno-1, 4-dimetil-3-(2-metil-1-propeno-1-il)-4-vinil-; Pico 5- Ácido tetradecanóico; Pico 6- Pirrol[1,2-a]pirazina-1,4-diona, hexahidro-; Pico 7- Ácido pentadecanóico; Pico 8- Pirrol[1,2-a]pirazina-1,4-diona, hexahidro-3-(2-metilpropil); Pico 9- Ácido Z-11-hexadecanóico; Pico 10- Ácido n-hexadecanóico; Pico 11- 1,4-Benzenodiamina, N-(1-metiletil)-N'-fenil; Pico 12 e Pico 13- Não identificados; Pico 14- Pirrol[1,2-a]pirazina-1,4-diona, hexahidro-3-(fenilmetil).

O extrato bruto, denominado E136, obtido através do cultivo da bactéria *Saccharopolyspora gregorii*, possuiu MIC de 2,0  $\text{mg.mL}^{-1}$  frente ao indicador *S. aureus* (Tabela 4). A composição do extrato bruto denominado E136 indicou 15 compostos identificados pela técnica de GC-MS (Figura 26). Entre esses compostos, oito deles

apresentam atividade antimicrobiana já descrita anteriormente, sendo estes os compostos pertencentes aos picos: 3, 2,4-imidazolidinadiona,5-metil-, pico 5, trans-1,10-Dimetil-trans-9-decalol-, pico 6, ácido tetradecanóico, pico 8, ácido pentadecanóico, pico 10, ácido n-hexadecanóico, pico 11, ácido heptadecanóico, e pico 12, ácido tridecanóico.

O composto indicado pelo pico 4 (Figura 26), fenol,2-metil-5-(1-metiletil)-, também conhecida como carvacrol, possui atividade antimicrobiana contra diversos tipos de microorganismos. Arfa e colaboradores (2006) mostram que o carvacrol inibe bactérias e leveduras, Burt (2004) mostrou a atividade do composto contra *E. coli*, *S. typhimurium*, *S. aureus* e *L. monocytogens*. O carvacrol associado ao óleo essencial da planta alecrim-pimenta (*Lippia sidoides*) inibe patógenos orais (Botelho et al., 2007).

Através do levantamento realizado na literatura, não foi identificada correlação de atividade antimicrobiana associada aos compostos dos picos 1, etanol,2-(2-butoxi)etoxi, pico 2, 2-pirrolidiona, e pico 14, ácido decanedióico bis(2-etilhexil) éster. Porém o composto do pico 2 tem potencial de ser um inseticida, pois estudos indicam que esse composto que está presente em teias de aranha, que possuem ação de proteção contra a invasão de formigas (Zhang et al., 2011).

O gênero *Saccharopolyspora* apresenta uma diversidade de espécies capazes de produzir compostos bioativos. A espécie *S. erytharea*, produz o importante antibiótico macrolídeo, a eritromicina, empregada para uso clínico (Reeves et al., 2002). Porém bactérias do mesmo gênero e isoladas de ambientes marinho também tem demonstrado a capacidade de produzir compostos antimicrobianos, como *S. salina* que produz compostos ainda não identificados que inibem o crescimento de bactérias, fungos e leveduras (Suthindhiran; Kannabiran, 2009).

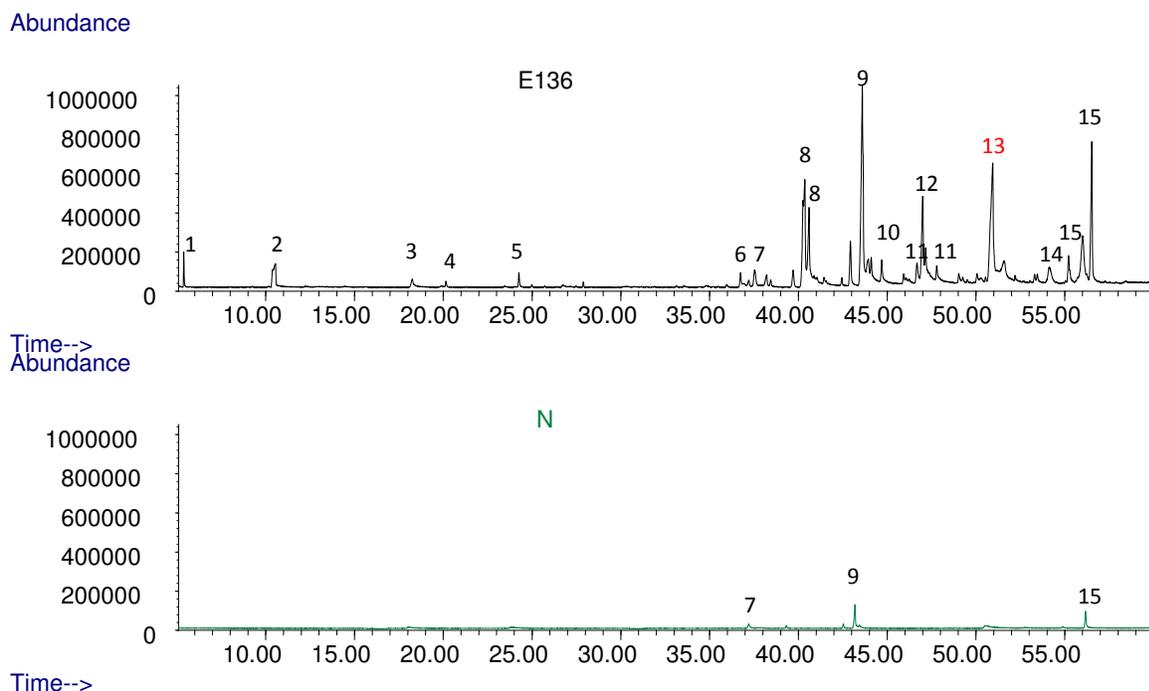


Figura 26. Cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massas dos extratos brutos denominados E136, obtido da espécie *Saccharopolyspora gregorii*, e N. Pico 1- Etanol, 2-(2-butoxi-etoxi)-; Pico 2- 2-Pirrolidiona; Pico 3- 2,4-Imidazolidinadiona,5-metil-; Pico 4- Fenol,2-metil-5-(1-metiletil)-; Pico 5- Trans-1,10-dimetil-trans-9-decalol-; Pico 6- Ácido tetradecanóico; Pico 7- Pirrol[1,2-a]pirazina-1,4-diona,hexahidro-; Pico 8- Ácido pentadecanóico; Pico 9- Pirrol[1,2-a]pirazina-1,4-diona,hexahidro-3-(2-metilpropil); Pico 10- Ácido n-hexadecanóico; Pico 11- Ácido heptadecanóico; Pico 12- ácido tridecanóico; Pico 13- Não identificado; Pico 14- Ácido decanedióico bis(2-etilhexil) éster; Pico15- Pirrol[1,2-a]pirazina-1,4-diona, hexahidro-3-(fenilmetil).

O extrato bruto obtido através do cultivo da bactéria de *Carnobacterium divergens*, denominado E108, apresentou resultados promissores de inibição das cepas C2135 e YUSA de *N. meningitidis*. A composição do extrato bruto (Figura 27) foi similar a composição do extrato bruto denominado N. É possível que a técnica não fosse capaz de identificar os compostos presentes no extrato bruto, pois essa técnica se restringe principalmente a compostos voláteis. A espécie *C. divergens* produz a bactericina Divercina V41, identificada pela técnica de *High-Performance Liquid Chromatography* (HPLC). Outra espécie desse gênero, *C. piscicola*, também produz uma bactericina denominada Pisicocina V1 (Pilet et al., 1995).

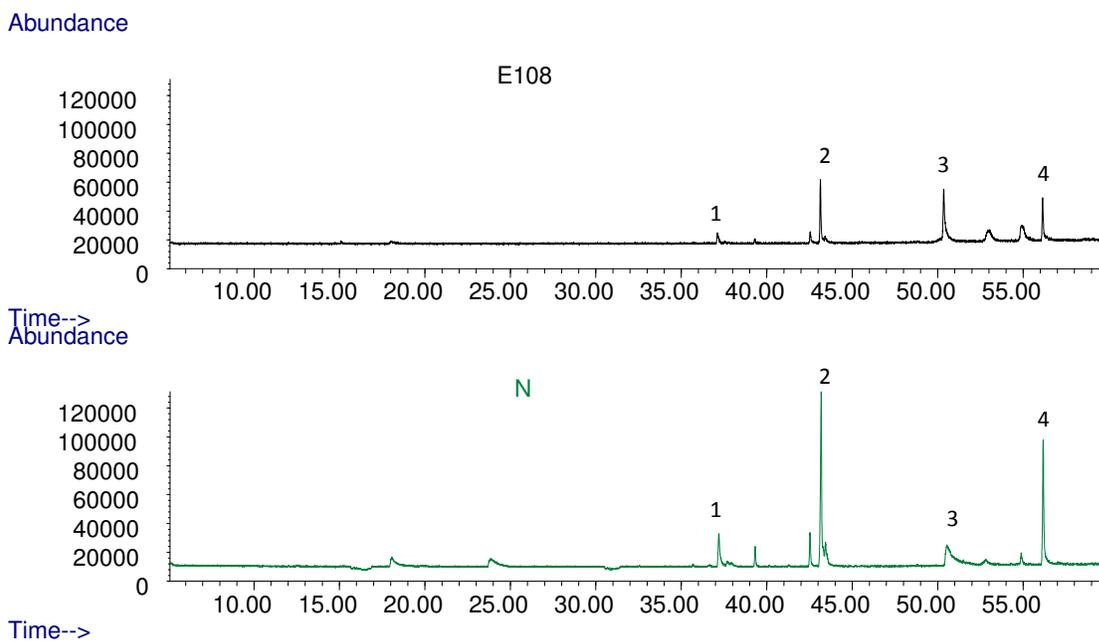


Figura 27. Cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massas dos extratos brutos denominados E108, obtido da espécie *Carnobacterium divergens*, e N. Pico 1- Pirrol[1,2-a]pirazina-1,4-diona,hexahidro-; Pico 2- Pirrol[1,2-a]pirazina-1,4-diona,hexahidro-3-(2-metilpropil); Pico 3- Não identificado; 4-Pirrol[1,2-a]pirazina-1,4-diona,hexahidro-3-(fenilmetil).

Os extratos brutos obtidos através do cultivo da bactéria *Planococcus rifitietoensis*, denominado E61, apresentou atividade inibitória contra *S. aureus* e *B. subtilis*, enquanto o extrato denominado E114, obtido do cultivo da bactéria *Planococcus donghaensis* apresentou atividade bacteriostática apenas frente a *B. subtilis*. A diferença nos extratos está relacionada à presença dos compostos indicados no pico 2, 5 e 6 (Figura 28), que correspondem ao composto 2(1H)-Piridiona, 3-metil-, composto 5,6-dihidro-6-metiluracil, e composto dietil ftalato, respectivamente. O composto do pico 6, dietil ftalato foi obtido da planta *Vicia villosa* e apresentou potencial como antimicrobiano contra *Rhizobium vitis* e *Bacillus subtilis* (Islam et al., 2013). Através do levantamento realizado em literatura, não foi identificada correlação de atividade antimicrobiana associada aos compostos do pico 3, etanol, 2-(2-butoxi)etoxi-, pico 2, 2(1H)-Piridiona,3-metil, e do pico 5, 5,6-dihidro-6-metiluracil.

O composto do pico 1, feniletil álcool, apresenta atividade antifúngica contra *Sclerotinia sclerotiorum* descrita por Fialho e colaboradores, (2011). Esse composto foi

derivado da levedura *Saccharomyces cerevisiae*. Os compostos indicados pelos picos 4, e 9, composto 2,4-imidazolidinadiona,5-metil e composto 1,4-benzenodiamina,N-(1-metiletil)-N'-fenil, respectivamente já foram abordados anteriormente por apresentarem atividade antimicrobiana. O composto do pico 10 gerou um fragmentograma que, pela técnica utilizada, não pôde ser identificado, pode se tratar de um composto que não está descrito na Biblioteca NIST/2005.

Bactérias do gênero *Planococcus* isoladas da Antártica, apresentaram potencial inibitório de bactérias e fungos, o que leva a crer que a Antártica, em especial o solo, é um reservatório de micro-organismos produtores de compostos antimicrobianos (O'Brien et al. 2004). A água do mar e os solos salinos também são fonte de bactérias desse gênero que possuem a capacidade de inibir bactérias e fungos patogênicos a seres humanos e fungos fitopatógenos, e possuem a capacidade de inibir o crescimento de células de carcinoma Bel 7402 (Chen et al., 2010).

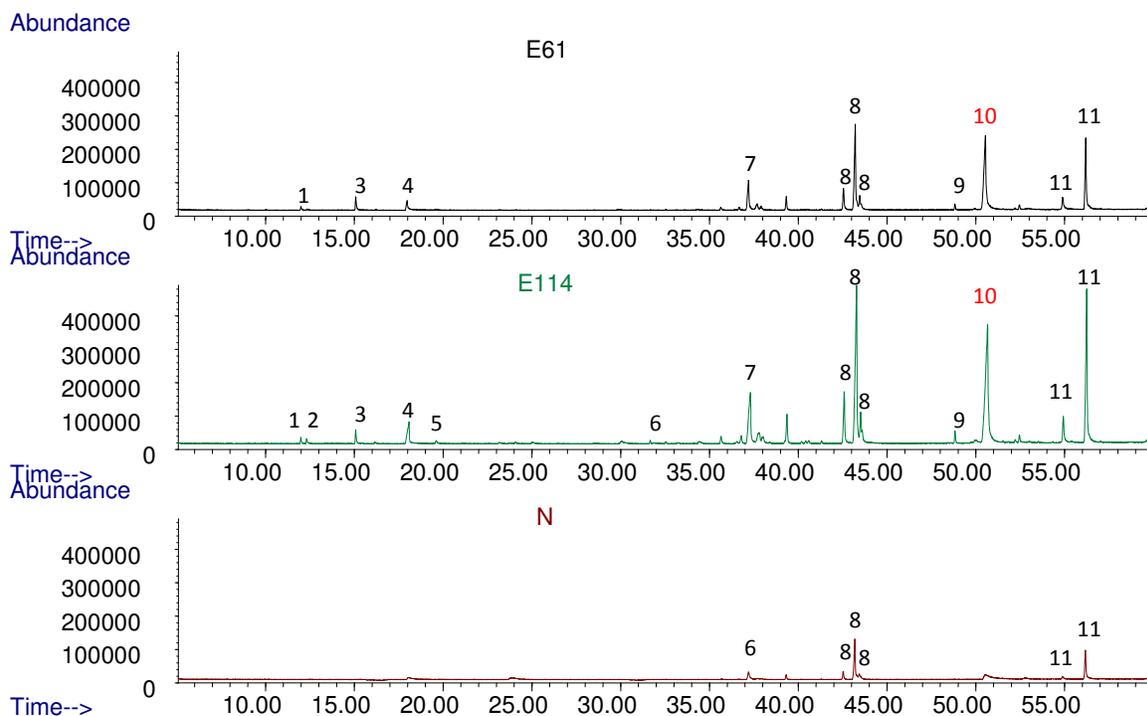


Figura 28. Cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massas dos extratos brutos denominados, E61, obtido da espécie *Planococcus rifitietoensis*, e E114, obtido da espécie *Planococcus donghaensis*, e N. Pico 1- Feniletil álcool; Pico 2- 2(1H)-Piridiona,3-metil-; Pico 3- Etanol,2-(2-butoxi)- ; Pico 4- 2,4-Imidazolidinadiona,5-metil-; Pico 5- 5,6-Dihidro-6-metiluracil; Pico 6- Dietil ftalato; Pico 7- Pirrol[1,2-a]pirazina-1,4-diona,hexahidro-; Pico 8- Pirrol[1,2-a]pirazina-1,4-diona,hexahidro-3-(2-metilpropil); Pico 9- 1,4- Benzenodiamina,N-(1-metiletil)-N'-fenil; Pico 10- Não identificado; Pico 11- Pirrol[1,2-a]pirazina-1,4-diona,hexahidro-3-(fenilmetil).

O extrato bruto denominando E111, obtido a partir do cultivo da bactéria *Algoriphagus aquamarinus*, apresentou atividade bacteriostática contra *M. luteus*. Apresentou nove compostos (Figura 29), sendo que os picos 1, 2,4-imidazolidinadiona,5-metil-, pico 3- ácido pentadecanóico, pico 5, ácido Z-11-hexadecanóico, e pico 6, ácido n-hexadecanóico, já foram citados anteriormente quanto a atividade antimicrobiana descrita em literatura. O diferencial da composição desse extrato são os compostos presentes apenas nele, referente aos picos 7, ciclohexano-1-(ciclohexilmetil)2-etil-,trans-metil-, e pico 8- 2,5-piperazinadiona,3,6-bis(2-metilpropil)-. Porém não foi identificada correlação de atividade antimicrobiana associada aos compostos através do levantamento realizado em literatura.

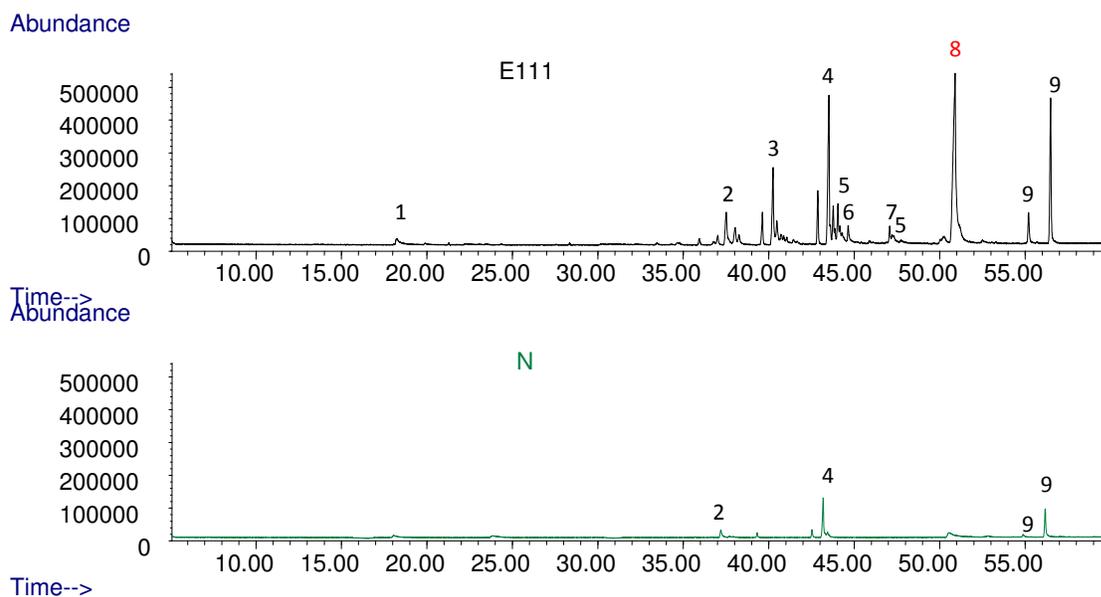


Figura 29. Cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massas dos extratos brutos denominados E111, obtido da espécie *Algoriphagus aquamarinus*, e N. Pico 1- 2,4-Imidazolidinadiona; 5-metil-, Pico 2- Pirrol[1,2-a]pirazina-1,4-diona hexahidro-; Pico 3- Ácido pentadecanóico; Pico4 - Pirrol[1,2-a]pirazina-1,4-diona,hexahidro-3-(2-metilpropil); Pico 5- Ácido Z-11-hexadecanóico; Pico 6 – Ácido n-hexadecanóico; Pico 7- Ciclohexano-1-(ciclohexilmetil)2-etil-,trans-metil; Pico 8- 2,5-Piperazinadiona,3,6-bis(2-metilpropil)-; Pico 9-Pirrol[1,2-a]pirazina-1,4-diona,hexahidro-3-(fenilmetil).

Os extratos brutos obtidos através do cultivo de bactérias do gênero *Marinilactibacillus*, denominados E65 e E105, foram inseridos na avaliação da atividade antimicrobiana contra as cepas de *Neisseria meningitidis*, por se tratar de um gênero descrito recentemente e por ser pouco conhecida a produção de compostos bioativos por esses micro-organismos. Dentre os dois extratos avaliados, o extrato bruto denominado E65 apresentou atividade antimicrobiana frente a cepa YUSA de *N. meningitidis*.

A avaliação da composição dos extratos brutos (Figura 30), tanto E65 quanto E105, indicou a presença de um composto cuja atividade antimicrobiana já foi citada anteriormente, o composto do pico 1, 2,4-imidazolidinadiona,5-metil-. Os picos 4 e 6, comuns em ambos os extratos brutos, geraram fragmentogramas que, pela técnica utilizada, não puderam ser identificados, pode se tratar de um composto que não está descrito na Biblioteca NIST/2005. Já o composto do pico 3, identificado como N-[2-

[ciclopentiloxi(metil)fosforil]sulfaniletíl]-N-propan-2-ilpropan-2-amina, não apresenta registros na literatura quanto ao potencial de produzir atividade inibitória contra bactérias e fungos.

Poucos estudos mostram atividade antimicrobiana de bactérias do gênero *Marinilactibacillus*, o que se deve também ao fato de se tratar de espécies descritas há pouco mais de uma década. No estudo realizado por Roth e colaboradores (2011) foi observada atividade antimicrobiana de isolados da espécie *M. psychrotolerans* ALK 9 com atividade contra *Listeria innocua* 81000-1 e *Listeria ivanovii* HPB 28, porém a composição química desses compostos ainda não é conhecida. Esses dados mostram que é importante identificar os compostos químicos associados a esses micro-organismos ainda pouco estudados, e que os compostos dos picos 4 e 6 que não foram identificados podem se tratar de novas moléculas.

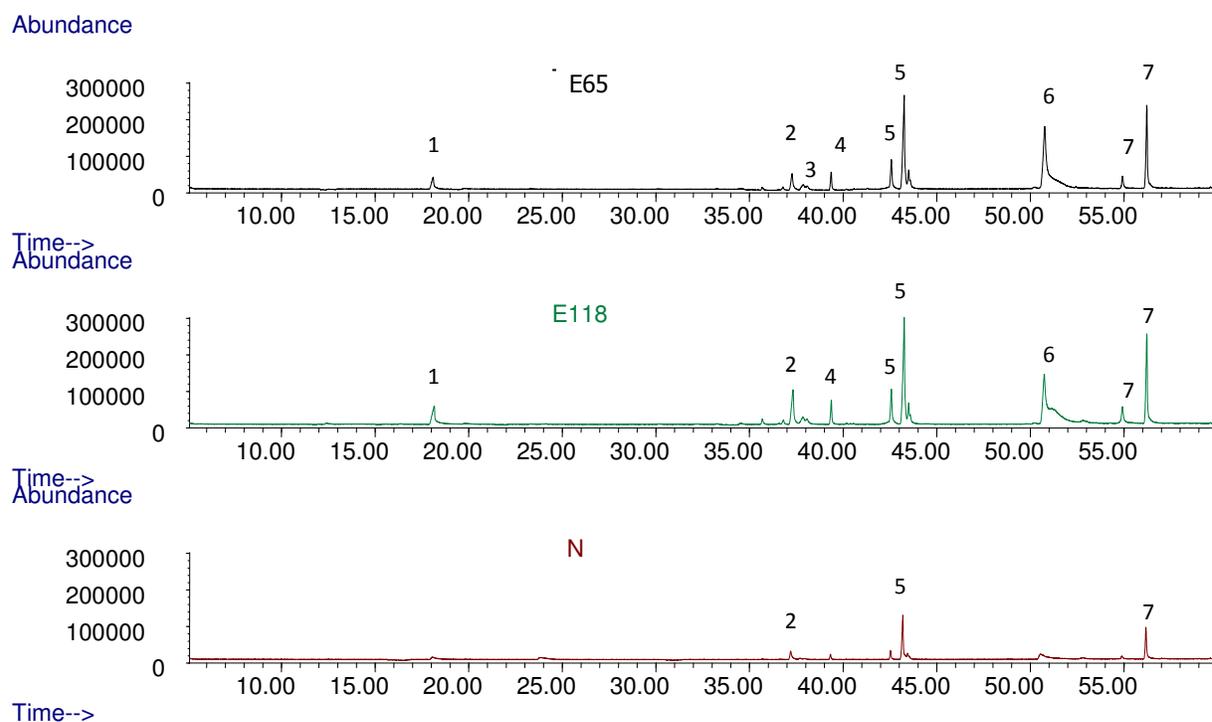


Figura 30. Cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massas dos extratos brutos denominados E118 e E65, obtidos da espécie *Marinilactibacillus piezotolerans*, e N. Pico 1- 2,4-Imidazolidinadiona,5-metil-; Pico 2- Pirrol[1,2-a]pirazina-1,4-diona,hexahidro-; Pico 3- o-ciclopentil S-2(diisopropilamino)etil metilfosfonotiolato; Pico 4- Não identificado; Pico 5-

Pirrol[1,2-a]pirazina-1,4-diona,hexahidro-3-(2-metilpropil); Pico 6- Não identificado; Pico 7- Pirrol[1,2-a]pirazina-1,4-diona,hexahidro-3-(fenilmetil).

Os extratos brutos avaliados quanto à composição química, apresentam, em sua maioria, ácidos graxos. Esses compostos são conhecidos por sua atividade antimicrobiana e podem ser obtidos de plantas (Agoramoorthy et al, 2007; Chen et al, 2011) e micro-organismos (Melo, et al., 2014). Micro-organismos isolados de ambientes de baixa temperatura geralmente aumentam as proporções de ácidos graxos, carotenoides polares e apresentam redução do comprimento médio das cadeias dos ácidos graxos. Estas alterações na composição dos micro-organismos são consideradas necessárias para manutenção da fluidez da membrana a temperaturas mais baixas (Margesin; Miteva, 2011; Fogliano et al. 2010).

Foram identificados compostos cuja atividade antimicrobiana não está diretamente relacionada a eles, de acordo com o levantamento bibliográfico realizado neste trabalho. No total, 17 compostos estavam associados a essa situação, e pertenciam aos extratos obtidos através do cultivo de bactérias dos gêneros *Pseudoalteromonas*, *Pseudomonas*, *Streptomyces*, *Saccharopolyspora*, *Marinilactibacillus*, *Planococcus* e *Algoriphagus*.

Na avaliação da composição dos extratos brutos, foi observado que cada extrato bruto apresenta mais de um composto identificado como potencial antimicrobiano. Isso indica que a atividade antimicrobiana pode estar associada a ação conjunta desses compostos.

Ao avaliar a atuação de antibióticos combinados contra *Staphylococcus epidermidis*, foi observado que o sinergismo entre os antimicrobianos possibilitou redução do biofilme (Monzón, et al., 2001). O sinergismo entre antimicrobianos foi positivo, quando avaliada a atividade antibactericida contra a *Acinetobacter baumannii* multirresistente (Yoon et al., 2004). A combinação de antibióticos é considerada como uma alternativa de tratamento contra *Enterococcus faecium* resistente a vancomicina, e já que as bactérias desse gênero possuem uma rápida capacidade de adquirir resistência e tolerância a antimicrobianos, o sinergismo de antibióticos pode ser uma alternativa para possibilitar o tratamento de cepas de *Enterococcus* (Kristich et al., 2014).

Para conhecer o potencial de cada um dos compostos identificados nos extratos, e verificar qual deles apresenta maior potencial antimicrobiano, foi realizado o fracionamento dos extratos brutos para tentar separá-los através de solventes de diferentes polaridades.

### **5.9.1. FRACIONAMENTO DOS EXTRATOS BRUTOS**

O fracionamento dos extratos brutos denominados E6, E38, E50 E53, E76 e E131, foi realizado com os solventes apolar, hexano, solvente de média polaridade, diclorometano e metanol, e solvente polar. A recuperação da massa nas frações foi superior a 70% para E6, E38, E50, E76 e E131 (Tabela 8). Apenas para E53 apresentou baixa recuperação, 27%, é possível que o uso da sílica com características polares pode não ter favorecido o fracionamento do E53, que pode ter se ligado de forma irreversível à sílica. Para todos os extratos observados, as maiores massas do extrato foram recuperadas pelo solvente metanol, o que indica que os extratos apresentam maior afinidade com solvente polar.

A partir dos resultados obtidos, estudos futuros podem possibilitar a identificação dos compostos presentes nas frações e os testes de microdiluição podem indicar se a separação dos compostos pelo fracionamento possibilita a obtenção de maior atividade antimicrobiana ou se os compostos atuam melhor quando atuam em conjunto, ou seja, quando não há o fracionamento.

Tabela 8. Balanço de massas do fracionamento dos extratos brutos utilizando três solventes de diferentes polaridades.

<b>Amostra</b>	<b>Solvente</b>	<b>Massa (%)</b>	<b>Recuperação de massa nas frações (%)</b>
<b>E6</b>	Hexano	8,79	86,42
	Diclorometano	6,07	
	Metanol 1	61,66	
	Metanol 2	9,90	
<b>E38</b>	Hexano	2,86	96,36
	Diclorometano	18,93	
	Metanol 1	69,17	
	Metanol 2	5,39	
<b>E50</b>	Hexano	3,80	97,10
	Diclorometano	7,69	
	Metanol 1	49,91	
	Metanol 2	35,71	
<b>E53</b>	Hexano	0,52	27,74
	Diclorometano	0,00	
	Metanol 1	14,67	
	Metanol 2	12,56	
<b>E76</b>	Hexano	0,61	77,76
	Diclorometano	0,55	
	Metanol 1	51,50	
	Metanol 2	25,10	
<b>E131</b>	Hexano	3,31	99,68
	Diclorometano	0,92	
	Metanol 1	91,79	
	Metanol 2	3,67	

## 6. CONCLUSÕES

---

As bactérias isoladas neste estudo pertencem aos Filos Proteobacteria, Firmicutes, Bacteroidetes e Actinobacteria, grupos anteriormente isolados no ambiente antártico conforme relatos da literatura.

A atividade antimicrobiana foi detectada em 18 extratos brutos obtidos de bactérias frente as cepas não virulentas. Dentre os extratos brutos com atividade antimicrobiana destacou-se o extrato denominado E131, obtidos da bactéria ANT\_B131 identificada como *Streptomyces* sp. que foi o mais promissor frente a micro-organismos não-virulentos.

Frente a micro-organismos virulentos, os extratos brutos obtidos de bactérias da Antártica apresentaram atividade antimicrobiana as cepas de *Neisseria meningitides*. Destacaram-se os extratos brutos maior potencial de atividade antimicrobiana, os obtidos pelos isolados ANT\_B46 e ANT\_B76, identificados como *Pseudoalteromonas* sp., e ANT\_B146, *Pseudomonas azotoformans* CUG 12536.

Destacou-se a atividade antimicrobiana observada pelos extratos obtidos pelas bactérias do gênero *Marinilactibacillus* (ANT\_B65) frente a cepa YUSA de *N. meningitides*. Esse gênero possui duas espécies descritas a menos de uma década cuja produção de compostos antimicrobianos ainda é pouco conhecida. A análise do perfil químico do extrato bruto denominado E65 indicou que esses possuem produzem compostos cuja atividade antimicrobiana está descrita na literatura científica.

As bactérias do gênero *Marinilactibacillus*, ANT\_B65 e ANT\_B105 podem ser potenciais novas espécies do gênero, sendo necessários estudos taxonômicos complementares para confirmação da hipótese.

Quanto a avaliação do perfil químico dos extratos brutos que apresentaram atividade antimicrobiana, verificou-se que estes possuem compostos cuja atividade antimicrobiana foi descrita na literatura, e compostos cuja atividade antimicrobiana não é conhecida. Além

desses, não foi possível de identificar alguns compostos através da técnica utilizada, porém estes estão presentes em extratos com atividade antimicrobiana promissora.

Os extratos obtidos de isolados dos gêneros *Pseudoalteromonas*, *Marinomonas*, *Stenotrophomonas*, *Streptomyces*, *Saccharopolyspora*, e *Algoriphagus* produzem ácidos graxos com atividade antimicrobiana descrita na literatura. O fracionamento dos extratos brutos indicou que estes são, em sua maioria, solúveis a solventes polares (metanol).

As bactérias isoladas da Antártica produzem compostos de interesse farmacológico e podem ser utilizadas como fonte de novos compostos. Tais resultados enfatizam a necessidade de mais estudos de bactérias associadas a ambientes extremos, como a Antártica.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---

- Agoramoorthy, G.; Chandrasekaran, M.; Venkatesalu, V.; Hsu, M. J. (2007) Antibacterial and antifungal activities of fatty acid methyl esters of the blind-your-eye mangrove from India. *Braz. J. Microbiol.*, 38: 739-742.
- Akagawa-Matsushita, M.; Itoh, T.; Katayama, Y.; Kuraishi, H.; Yamasato, K.; (1992) Isoprenoid quinone composition of some marine *Alteromonas*, *Murinomonas*, *Deleya*, *Pseudomonas* and *Shewanella* species. *J. Cen. Microbiol.* 138:2275-2281.
- Akhaja, T. N.; Raval, J. P. (2011) 1,3-Dihydro-2H-indol-2-ones derivatives: design, synthesis, in vitro antibacterial, antifungal and antitubercular study. *Eur. J. Med. Chem.*, 46:5573-5579.
- Amann, R. I.; Ludwig, W.; Schleifer, K. H. (1995) Phylogenetic identification & in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol. Rev.*, 59:143– 169.
- Arfa, B.;Combes, S.; Preziosi-Belloy, L.; Gontard, N.; Chalier, P. (2006) Antimicrobial activity of carvacrol related to its chemical structure. *Lett Appl Microbiol.*, 43:149-154.
- Asencio, G.; Lavin, P.; Alegría, K.; Domínguez, M.; Bello, H.; González-Rochab, G.; González-Aravena, M.; (2014) Antibacterial activity of the Antarctic bacterium *Janthinobacterium* sp: SMN 33.6 against multi-resistant Gram-negative bacteria. *Journal of Biotechnology*, 17: 1-5.
- Ayuso-Sacido A.; Genilloud. (2005) O. New PCR primers for the screening of NRPS and PKS-I systems in actinomycetes: Detection and distribution of these biosynthetic gene sequences in major taxonomic groups. *Microbial Ecology*, 49:10-24.
- Bacot, C. M.; Reeves, R. H. (1991) Novel tRNA gene organization in the 16S-23S intergenic spacer of the *Streptococcus pneumoniae* rRNA gene cluster. *J Bacteriol.* 173(13):4234–4236.
- Baltz, H. R. (2008) Renaissance in antibacterial discovery from actinomycetes *Current Opinion in Pharmacol.*, 8: 557–563.
- Barbeyron, T.; L'haridon, S.; Corre, E.; Kloareg, B.; Potin, P. (2001). *Zobellia galactanovorans* gen. nov., sp. nov., a marine species of Flavobacteriaceae isolated from a red alga, and classification of [Cytophaga] uliginosa (ZoBell and Upham 1944) Reichenbach 1989 as *Zobellia uliginosa* gen. nov., comb. nov. *International Journal of Systematic Evolu. Microbiol.*, 51, 985-997.
- Barbieri, E.; Barry, K.; Child, A.; Wainwright, N. (1997) Antimicrobial activity in the microbial community of the accessory nidamental gland and egg cases of *Loligo pealei* (Cephalopoda:Loliginidae). *Biol. Bull.* , 193: 275-276.
- Behrendt, U.; Ulrich, A.; Schumann, P. (2003) Fluorescent *Pseudomonas* associated with the phyllosphere of grasses; *Pseudomonas trivialis* sp. nov., *Pseudomonas poae* sp. nov. and

- Pseudomonas congelans* sp. nov. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 53: 1461–1469.
- Blunt, J. W.; Copp, B. R.; Wan-Ping Hu; Munro, M. H. G.; Northcote, P. T.; Prinsep, M.C. (2008) Marine natural products. Nat. Prod. Rep., 25: 35–94.
- Botelho, M. A.; Nogueira, N. A.; Bastos, G. M.; Fonseca, S. G.; Lemos, T. L.; Matos, F. J.; Montenegro, D.; Heukelbach, J.; Rao, V. S.; Brito, G. A. (2007) Antimicrobial activity of the essential oil from *Lippia sidoides*, carvacrol and thymol against oral pathogens. Braz J Med Biol Res., 40: 349-356 .
- Bowman, J.P. (1998) *Pseudoalteromonas prydzensis* sp. Nov., a psychrotrophic, halotolerant bacterium from Antarctic sea ice. Int. J. Syst. Bacteriol., 48: 1037-1041.
- Bowman, J.P.; Cavanagh, J.; Austin, J.J.; Sanderson, K. (1996) Novel *Psychrobacter* species from Antarctic ornithogenic soils. Int. J. Syst. Bacteriol., 46: 841-848.
- Bowman, J.P.; Nichols, D.S.; Mcmeekin, T.A. (1997) *Psychrobacter glacincola* sp. Nov., a halotolerant, psychrophilic bacterium isolated from Antarctic sea ice. Syst. Appl. Microbiol., 20: 209-215.
- Bozal, N.; Montes, M.J.; Tudela, E.; Guinea, J. (2003) Characterization of several *Psychrobacter* strains isolated from Antarctic environments and description of *Psychrobacter luti* sp. nov. and *Psychrobacter fozii* sp. Nov. Int. J. Syst. Evol. Microbiol., 53: 1093-1100.
- Bozal, N.; Tudela, E.; Rosselló-Mora, R.; Lalucat, J.; Guinea, J. (1997) *Pseudoalteromonas antarctica* sp. Nov., isolated from Antarctic coastal environment. Int. J. Syst. Bacteriol., 47: 345-351.
- Bredholdt, H.; Galatenko, O. A.; Engelhardt, K.; Fjærvik, E.; Terekhova L. P.; Zotchev S. B. (2007) Rare actinomycete bacteria from the shallow water sediments of the Trondheim fjord, Norway: isolation, diversity and biological activity. Environmental Microbiology, 9(11): 2756–2764.
- Brown, M. V.; Bowman, J. P. (2001) A molecular phylogenetic survey of sea-ice microbial communities (SIMCO). FEMS Microbiol Ecol. 35: 267–275.
- Bruntner, C.; Binder, T.; Pathom-aree, W.; Goodfellow, M. (2005) Frigocyclinone, a Novel Angucyclinone Antibiotic Produced by a *Streptomyces griseus* Strain from Antarctica. J. Antibiot., 58:346-349.
- Burja, A.M.; Webster, N.; Murphy, P.; Hill, R.T. (1999) Microbial symbionts of Great Barrier Reef sponges. Mem. Qld. Mus. 44: 63–75.
- Burt, S. (2004) Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods - a review. Int J Food Microbiol., 94:223-53.

- Busti, E.; Monciardini, P.; Cavaletti, L.; Bamonte, R.; Lazzarini, A.; Sosio, M.; Donadio, S. (2006) Antibiotic-producing ability by representatives of a newly discovered lineage of actinomycetes. *Microbiology*, 152:675-83.
- Castillo, U. F.; Strobel, G. A.; Ford, E. J.; Hess, W. M.; Porter, H., J.; James B.; Albert, H.; Robison, R.; Condrón, M. A. M.; Teplow, D. B.; Stevens, D.; Yaver, D. (2002) Printed in Great Britain Munumbicins, wide-spectrum antibiotics produced by *Streptomyces* NRRL 30562, endophytic on *Kennedia nigriscans*. *Microbiology*. 148: 2675–2685.
- Chelossi, E.; Milanese, M.; Milano, A.; Pronzato, R.; Riccardi, G. (2004) Characterization and antimicrobial activity of epibiotic bacteria from *Petrosia ficiformis* (Porifera, Demospongiae). *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 309: 21–33.
- Chen, H.; Yang, Y.; Xue, J.; Wei, J.; Zhang, Z.; Chen, H. (2011) Comparison of compositions and antimicrobial activities of essential oils from chemically stimulated agarwood, wild agarwood and healthy *Aquilaria sinensis* (Lour.) gilg trees. *Molecules*, 16:4884-4496.
- Chen, Y. H.; Kuo, J.; Sung, P.J.; Chang, Y.C.; Lu, M.C.; Wong, T.Y.; Liu, J.K.; Weng, C.F.; Twan, W. H.; Kuo, F.W. (2012) Isolation of marine bacteria with antimicrobial activities from cultured and field-collected soft corals. *World J Microbiol Biotechnol.* 12:3269-79.
- Cheng, Y.; Yang, M.; Matter, A. M. (2007) Characterization of a Gene Cluster Responsible for the Biosynthesis of Anticancer Agent FK228 in *Chromobacterium violaceum* No. 968. *Applied and Environmental Microbiology*, 73 (11): 3460–3469.
- Choi, J. S.; Park, N. H.; Hwang, S. Y.; Sohn, J. H.; Kwak, I.; Cho, K. K.; Choi, I. S. (2013) J The antibacterial activity of various saturated and unsaturated fatty acids against several oral pathogens. *Environ Biol.*, 34:673-6.
- CLSI. Método de referência para testes de diluição em caldo para a determinação da sensibilidade de leveduras à terapia antifúngica: Norma Aprovada, 2ª. ed, Norma M27-A2, 2002, vol.22, nº. 15.
- CLSI. Metodologia dos testes de sensibilidade a agentes antimicrobianos por diluição para bactéria de crescimento aeróbico. Clinical and Laboratorial Standards Institute, 6a. ed, CLSI Norma M7-A6, 2003, vol. 23 no. 2.
- CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Second Informational Supplement. Clinical and Laboratory Standards Institute, 31a. ed., CLSI Norma M02-A11 e M07-A9, 2012, vol. 32.
- Convey, P. (2010) Terrestrial biodiversity in Antarctica e Recent advances and future challenges. *Polar Science*, 4:135-147.
- Convey, P. (2013) Antarctic Ecosystems. *Encyclopedia of biodiversity*,1: 179–188.
- Convey, P., (2007) Antarctic Ecosystems. In: Levin, S.A. (Ed.), *Encyclopedia of Biodiversity*, second ed.). Elsevier, San Diego.doi:10.1016/B0-12-226865-2/00014-6

- Convey, P.; Chown, S. L.; Clarke, A.; Barnes, D. K. A.; Bokhorst, S.; Cummings, V.; Ducklow, H. W.; Frati, F.; Green, T. G.; Gordon, S.; Griffiths, W. J.; Howard-Williams, C.; Huiskes, A. D. H.; Laybourn-Parry, J.; Lyons, W. B.; McMinn, A.; Morley, S. A.; Peck, L. S.; Quesada, A.; Robinson, S. A.; Schiaparelli, S.; Wall, D. H. (2014) The spatial structure of Antarctic biodiversity. *Ecological Monographs*, 2: 203-244.
- Convey, P.; Stevens, M. I.; Hodgson, D. A.; Smellie, J. L.; Hillenbrand, C. D.; Barnes, D. K. A.; Clarke, A.; Pugh, P. J. A.; Linse, K.; Cary, S. C. (2009) Exploring biological constraints on the glacial history of Antarctica. *Quaternary Science Reviews*, 28: 3035–3048.
- Deinhard, G.; Blanz, P.; Poralla, K.; Alton, E. (1988) *Bacillus acidoterrestris* sp. Nov., a new thermotolerant acidophile isolated from different soils. *Syst. Appl. Microbiol.*, 10: 47-53.
- Delétoile, A.; Decré, D.; Courant, S.; Passet, V.; Audo, J.; Grimont, P.; Brisse, S. (2009). Phylogeny and identification of *Pantoea* species and typing of *Pantoea agglomerans* strains by multilocus gene sequencing. *Journal of clinical microbiology*, 47: 300-310.
- Dionigi, C.P., Lawlor, T.E., McFarland, J.E., Johnsen, P.B. (1993) Evaluation of geosmin and 2-methylisoborneol on the histidine dependence of T A 98 and TA 100 *Salmonella typhimurium* tester strains. *Wat. Res.*, 27: 1615-1618
- Dongfei, T.; Ruoqing, W.; Ming, L.; Yuexin, L. (2002) Studies on chemical compositions and antimicrobial activity of volatile oil of *Dictyophora echinovolvata*. *Mycosystema*, 21: 228.
- Dunlap, W. C.; Battershill, C. N.; Liptrot, C. H.; Cobb, R. E.; Bourne, D. G.; Jaspars, M.; Long, P. F.; Newman, D. J. (2007) Biomedicinals from the phytosymbionts of marine invertebrates: A molecular approach. *Methods*, 42: 358–376.
- EPA (1998) Status of Pesticides in Registration, Reregistration and Special Review p.336. EPA 738-R-98-002.
- Euzéby, J.P. (1997) List of Bacterial Names with Standing in Nomenclature: a folder available on the Internet. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 47: 590-592. (List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature. <<http://www.bacterio.net>>.
- Ezhilan, B. P.; Neelamegam, R. (2012) GC-MS analysis of phytocomponents in the ethanol extract of *Polygonum chinense* L. *Pharmacognosy Research*, 4:11-14.
- Felsenstein, J. (1985) Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution*, 39:783-791.
- Fernandez Moreno, M.A.; Vallin, C.; Malpartida, F. (1997) Streptothricin biosynthesis is catalyzed by enzymes related to nonribosomal peptide bond formation. *J. Bacteriol.*, 179: 6929-6936.
- Fialho, M. B.; Moraes, M. D. H.; Tremocoldi, A. R.; Pascholati, S. F.. Potential of antimicrobial volatile organic compounds to control *Sclerotinia sclerotiorum* in bean seeds. *Pesq. agropec. bras.*, 46: 137-142.

- Fiedler H. P.; Bruntner, C.; Bull, A. T.; Ward, A. C.; Goodfellow, M.; Potterat, O.; Puder, C.; Mihm, G. (2005) Marine actinomycetes as a source of novel secondary metabolites. *Antonie van Leeuwenhoek*, 87: 37–42.
- Fogg, G. E. (1998) *The biology of Polar habitats*. Oxford University Press, Oxford, UK.
- Fogliano V.; Andreoli, C.; Martello, A.; Caiazzo, M.; Lobosco, O.; Formisano, F.; Carlino, P.A.; Meca, G.; Graziani, G.; Di Martino; Rigano, V.; Vona, V.; Carfagna, S.; Rigano, C. (2010) Functional ingredients produced by culture of *Koliella antarctica*. *Aquaculture*, 299:115–120.
- Fondi, M.; Orlandini, V.; Perrin, E.; Maida, I.; Bosi, E.; Papaleo, M. C.; Michaud, L.; Lo Giudice, A.; de Pascale, D.; Tutino, M. L. (2014) Draft genomes of three Antarctic *Psychrobacter* strains producing antimicrobial compounds against *Burkholderia cepacia* complex, opportunistic human pathogens. *Marine Genomics*, 13: 37-38.
- Franzmann, P.D.; Höpfl, P.; Weiss, N.; Tindall, B.J. (1991) Psychrotrophic, lactic acid-producing bacteria from anoxic waters in Ace Lake, Antarctica: *Carnobacterium funditum* sp. Nov. And *Carnobacterium alterfunditum* sp. Nov. *Arch. Microbiol.*, 156: 255-262.
- Gandhimathi, R.; Arunkumar, M.; Selvin, J; Thangavelu, T.; Sivaramakrishnan, S.; Kiran; G. S.; Shanmughapriya, S., Natarajaseenivasan, K. (2008) Antimicrobial potential of sponge associated marine actinomycetes. *J. Mycologie Médicale*, 18: 16-22.
- Gauthier, G., Gauthier, M.; Christen, R. (1995) Phylogenetic analysis of the genera *Alteromonas*, *Shewanella* and *Moritella* using genes coding for small-subunit rRNA sequences and division of the genus *Alteromonas* into two genera, *Alteromonas* (emended) and *Pseudoalteromonas* gen. Nov., and proposal of twelve new species combinations. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 45: 755-761.
- Gesheva V.; Negoita T.: (2012) Psychrotrophic microorganism communities in soils of Haswell Island, Antarctica, and their biosynthetic potential. *Polar Biol*, 35: 291-297.
- Geyer, K. M.; Altrichter, A. E.; Takacs-Vesbach, C. D.; Van Horn, D. J.; Gooseff, M. N.; Barrett, J. H. (2014) Bacterial community composition of divergent soil habitats in a polar desert. *Fems Microbiology Ecology*, 89: 490-494.
- Ginolhac, A.; Jarrin, C.; Gillet, B.; Robe, P.; Pujic, P.; Tuphile K.; Bertrand H.; Vogel T.M.; Perriere, G.; Simonet, P.; Nalin, R.(2004) Phylogenetic analysis of polyketide synthase I domains from soil metagenomic libraries allows selection of promising clones. *Appl Environ Microbiol*, 70: 5522–5527.
- Gokhale, R.S; Tsuji, S.Y.; Cane, D.E.; Khosla, C. (1999) Dissecting and exploiting intermodular communication in polyketide synthases. *Science*, 284:482-485.
- Goodfellow, M., Kumar, Y., Labeda, D.P., Sembiring, L. (2008) The *Streptomyces violaceusniger* clade: a home for *Streptomyces* with rugose ornamented spores. *Antonie van Leeuwenhoek*, 92: 173-199..

- Gordon, D.; Abaijan, C.; Green, P. (1998) Consed: a graphical tool for sequence finishing. *Genome research*, 8:195-202.
- Gratia, E.; Weekers, F.; Margesin, R.; D'Amico, S.; Thonart, P.; Feller, G. (2009) Selection of a cold-adapted bacterium for bioremediation of wastewater at low temperatures. *Extremophiles*, 13:763–768.
- Gupta, P.; Chaturvedi, P.; Pradhan, S.; Delille, D.; Shivaji, S. (2006) *Marinomonas polaris* sp. Nov., a psychrohalotolerant strain isolated from coastal sea water off the subantarctic Kerguelen islands. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 56: 361-364.
- Hall, T. A. (1999) BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp.*, 41:95-98.
- Haridas, V.; Naik, S. (2013) Natural macromolecular antifreeze agents to synthetic antifreeze agents. *Rsc Advances*, 3: 14199-14218.
- Healy, M.; Webster-Brown, J. G.; Brown, K. L.; Lane, V. (2006) Chemistry and stratification of Antarctic meltwater ponds II: Inland ponds in McMurdo Dry Valleys, Victoria Land. *Antarctic Science* 18:525–533.
- Henriquez, M.; Vergara, K.; Norambuena, J.; Beiza, A.; Maza, F.; Ubilla, P.; Araya, I.; Chavez, R.; San-Martin, A.; Darias, J. (2014) Diversity of cultivable fungi associated with Antarctic marine sponges and screening for their antimicrobial, antitumoral and antioxidant potential. *World Journal Of Microbiology & Biotechnology*, 30: 65-76.
- Hill, D. J.; Griffiths, N. J.; Borodina, E.; Virji, M. (2010) Cellular and molecular biology of *Neisseria meningitidis* colonization and invasive disease. *Clin Sci.*, 118:547-564.
- Hogg, I.D.; Cary, S.C.; Convey, P.; Newsham, K.; O'Donnell, T.; Adams, B.J.; Aislabie, J.; Frati, F.F.; Stevens, M.I.; Wall, D.H. (2006) Biotic interactions in Antarctic terrestrial ecosystems: are they a factor? *Soil Biol. Biochem.*, 38: 3035-3040.
- Hossain, M. S.; Hossain, M. A.; Islam, R.; Alam, A. H.; Kudrat-e-Zahan, Sarkar S.; Farooque, M. A. (2004) Antimicrobial and cytotoxic activities of 2-aminobenzoic acid and 2-aminophenol and their coordination complexes with Magnesium (Mg-II) *Pak J Biol Sci.*,7:25–7.
- Hunter-Cevera, J. C.; Belt, A. (1996) *Maintenance Cultures for Biotechnology and Industry*. London, Academic Press, 263 p.
- Ichikawa, T.; Ishikura, T.; Ozaki, A. (1971) Improvement of Kasugamycin – producing strain by the agar piece method and prototroph method. *Folia Microbiologica*, 16:218-224.
- Ishikawa, M.; Nakajima, K.; Yanagi, M.; Yamamoto, Y.; Yamasato, K. (2003) *Marinilactibacillus psychrotolerans* gen. Nov., sp. Nov., a halophilic and alkaliphilic marine lactic acid bacterium isolated from marine organisms in temperate and subtropical areas of Japan. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 53:711-720.

- Islam, M.T.; Ahn, S.-Y.; Cho, S.M.; Yun, H.K. (2013) Isolation of antibacterial compounds from hairy vetch (*Vicia villosa*) against grapevine crown gall pathogen. *Horticulture, Environment, and Biotechnology*, 54, 338.
- Ivanova, E. P.; Sawabe, T.; Alexeeva, Y. V.; Lysenko, A. M.; Gorshkova, N. M.; Hayashi, K.; Zukova, N. V.; Christen, R.; Mikhailov, V.V. (2002) *Pseudoalteromonas issachenkonii* sp. nov., a bacterium that degrades the thallus of the brown alga *Fucus evanescens*. *Int J Syst Evol Microbiol.*, 52: 229-34.
- Jadhav, V. V.; Yadav, A.; Shouche, Y. S. (2013) Studies on biosurfactant from *Oceanobacillus* sp BRI 10 isolated from Antarctic sea water. *Desalination*, 318: 64-71.
- Jansson, J. K.; Tas, N. (2014) The microbial ecology of permafrost. *Nature Reviews Microbiology*, 12: 414-425.
- Junge1,K.; Gosink, J. J.; Hoppe, H. G.; Staley1, J. T. (1998) *Arthrobacter*, *Brachy bacterium* and *Planococcus* Isolates Identified from Antarctic Sea Ice Brine. Description of *Planococcus mcmeekinii*, sp. nov. *Systematic and Applied Microbiology*, 21: 306–314.
- Kaper, J. B.; Nataro, J. P.; Mobley, H. L. (2004). Pathogenic *Escherichia coli*. *Nature Reviews Microbiology*, 2: 123-140.
- Kathiresan, K.; Thiruneelakandan, G. (2008) Prospects of lactic acid bacteria of marine origin. *Indian Journal of Biotechnology*. 7: 170–177.
- Khatami, A.; Pollard, A. J. (2010) The epidemiology of meningococcal disease and the impact of vaccines. *Expert Rev Vaccines*, 9:285-98.
- Kim, J.G.; Park, S.J.; Quan, Z. X.; Jung, M. Y.; Cha, I.T.; Kim, S.J.; Kim, K.H.; Yang, E.J.; Kim, Y.N.; Lee, S.H.; Rhee, S.K. (2014) Unveiling abundance and distribution of planktonic Bacteria and Archaea in a polynya in Amundsen Sea, Antarctica. *Environmental Microbiology*, 16: 1566-1578.
- Kimura, M. (1980) A simple model for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution*, 16:111-120.
- Kirsop Kleinkauf, H.; von Döhren, H. (1990) Nonribosomal biosynthesis of peptide antibiotics. *Eur J Biochem.*, 192:1-15.
- Kirsop, B. E.; Doyle, A. (1991) Maintenance of microorganisms, cell cultures – A Manual Laboratory Methods. 2<sup>nd</sup> ed., London, Academic Press. 308p.
- Kristich, C. J.; Rice, L. B.; Arias, C. A. (2014) Enterococcal Infection—Treatment and Antibiotic Resistance. *Eye and Ear Infirmary*.
- Lane, D.J. (1991) 16S/23S rRNA sequencing. In: Goodfellow M, Stackebrandt E (eds) *Nucleic acid techniques in bacterial systematics*. Chichester: John Wiley & Sons, 115-147.

- Lane, D.J.; Pace, B.; Olsen, G.J.; Stahl, D.A.; Sogin, M.L.; Pace, N.R. (1985) Rapid determination of 16S ribosomal RNA sequences for phylogenetic analysis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 82: 6955-6959.
- Le, T. H.; Sivachidambaram, V.; Yi, X.; Li, X.; Zhou, Z. (2014) Quantification of polyketide synthase genes in tropical urban soils using real-time PCR. *J Microbiol Methods*, 106:135-142.
- Lee, Y. M.; Kim, E. H.; Lee, H. K.; Hong, S. G. (2014) Biodiversity and physiological characteristics of Antarctic and Arctic lichens-associated bacteria. *World Journal Of Microbiology & Biotechnology*, 30: 2711-2721.
- Li, J.; Dong, J. D.; Yang, J., Luo, X. M.; Zhang, S. (2014) Detection of polyketide synthase and nonribosomal peptide synthetase biosynthetic genes from antimicrobial coral-associated actinomycetes. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 106:623-35.
- Li, J.; Neubauer, P. (2014) *Escherichia coli* as a cell factory for heterologous production of nonribosomal peptides and polyketides. *New Biotechnology*, 31: 579-585.
- Liu, C.; Chen, C.X.; Zhang, X.Y.; Yu, Y.; Liu, A.; Li, G.W.; Chen, X.L.; Chen, B.; Zhou, B.C.; Zhang, Y.Z. (2012) *Marinobacter antarcticus* sp. Nov., a halotolerant bacterium isolated from Antarctic intertidal sandy sediment. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 62: 1838-1844.
- Liu, J. T.; Lu, X. L.; Liu, X. Y.; Gao, Y.; Hu, B.; Jiao, B. H.; Zheng, H. (2013) Bioactive natural products from the Antarctic and Arctic organisms. *Mini-Reviews In Medicinal Chemistry*, 13: 617-626.
- Lo Giudice, A.; Bruni, V.; Michaud, L. (2007) Characterization of Antarctic psychrotrophic bacteria with antibacterial activities against terrestrial microorganisms. *J. Basic Microbiol.* 47(6):496-505.
- Lucas-Elío, P.; Gómez, D.; Solano, F.; Sanchez-Amat, A. (2006) The antimicrobial activity of marinocine, synthesized by *Marinomonas mediterranea*, is due to hydrogen peroxide generated by its lysine oxidase activity. *J Bacteriol.*, 188:2493-2501.
- Mangano, S.; Michaud, L.; Caruso, C.; Brilli, M.; Bruni, V.; Fani, R.; Lo Giudice, A. (2009) Antagonistic interactions between psychrotrophic cultivable bacteria isolated from Antarctic sponges: a preliminary analysis. *Res Microbiol.*, 160: 27-37.
- Margesin, R.; Feller, G.; Gerday, C.; Russell, N.J. (2002) Cold-adapted microorganisms: adaptation strategies and biotechnological potential. *Encyclopedia of Environmental Microbiology*, 2: 871–885.
- Margesin, R.; Miteva, V. (2011) Diversity and ecology of psychrophilic microorganisms. *Res Microbiol*, 162:346-361.

- Martin, N. G.; Snape, M. D. (2013) A multicomponent serogroup B meningococcal vaccine is licensed for use in Europe: what do we know, and what are we yet to learn? *Expert Rev Vaccines*, 12:837-858.
- Martin, S.M.; Kau, D.A.; Wringley, S.K.: (2006) Scale-up of natural product isolation, *Methods in Biotechnology*, 20:439-461.
- Melo, I. S.; Santos, S. N.; Rosa, L. H.; Parma, M. M.; Silva, L. J.; Queiroz, S. C. (2014). Isolation and biological activities of an endophytic *Mortierella alpina* strain from the Antarctic moss *Schistidium antarctici*. *Extremophiles* 18, 15–23.
- Metsa-Ketela M.; Salo V.; Halo L.; Hautala A.; Hakala J.; Mantsala P.; Ylihonko K. (1999) An efficient approach for screening minimal PKS genes from Streptomyces. *FEMS Microbiology Letters*, 180:1-6.
- Michaud, L.; Lo Giudice, A.; Mysara, M.; Monsieurs, P.; Raffa, C.; Leys, N.; Amalfitano, S.; Van Houdt, (2014) Snow Surface Microbiome on the High Antarctic Plateau (DOME C). *Plos One*, 9: 104505.
- Mincer, T.J.; Fenical, W.; Jensen, P.R. (2005) Culture-dependent and culture-independent diversity within the obligate marine actinomycete genus *Salinispora*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 71:7019-7028.
- Mincer, T.J.; Jensen, P.R.; Kauffman, C.A.; Fenical, W. (2002) Widespread and persistent populations of a major new marine actinomycete taxon in ocean sediments. *Appl. Environ. Microbiol.*, 68:5005-5011.
- Mohimani, H.; Liu, W.; Kersten, R. D.; Moore, B. S.; Dorrestein, P. C.; Pevzner, P. A. (2014) NRPquest: Coupling Mass Spectrometry and Genome Mining for Nonribosomal Peptide Discovery . *Journal of natural products*, 77: 1902 -1909.
- Mondol, M.A.; Shahidullah, T. F.; Kim, J.H.; Lee, M.A.; Lee, H.S.; Lee, J.S.; Lee, Y.J.; Shin, H.J. (2012) New antimicrobial compounds from a marine-derived *Bacillus* sp. *J Antibiot.* 66(2):89-95.
- Montes, M.J.; Bozal, N.; Mercadé, E. (2008) *Marinobacter guineae* sp. Nov., a novel moderately halophilic bacterium from an Antarctic environment. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 58: 1346-1349.
- Monzón, M.; Oteiza, C.; Leiva, J.; Amorena, J. (2001) Synergy of different antibiotic combinations in biofilms of *Staphylococcus epidermidis*. *J. Antimicrob. Chemother.*, 48:793-801.
- Muliandi, A.; Katsuyama, Y.; Sone, K.; Izumikawa, M.; Moriya, T.; Hashimoto, J.; Kozone, I.; Takagi, M.; Shin-ya, K.; Ohnishi, Y. (2014) Biosynthesis of the 4-Methyloxazoline-Containing Nonribosomal Peptides, JBIR-34 and -35, in *Streptomyces* sp. Sp080513GE-23. *Chemistry & Biology*, 21: 923-934.

- Murphy, A. C.; Gao, S.; Han, L. C.; Carobene, S.; Fukuda, D.; Song, Z.; Hothersall, J.; Cox, R. J.; Crosby, J.; Crump, M. P.; Thomas, C. M.; Willis, C. L.; Simpson, T. J. (2014): Biosynthesis of thiomarinol A and related metabolites of *Pseudoalteromonas* sp. SANK 73390. *Chemical Science*, 5: 397-402.
- Nakajima, M., Ogura, T., Kusama, Y., Iwabuchi, N., Imawaka, T., Araki, A., Sasaki, T., Hirose, E., and Sunairi, M. (1996) Inhibitory effects of odor substances, geosmin and 2-methylisoborneol, on early development of sea urchins. *Wat. Res.*, 30: 2508-2511
- Nedashkovskaya, O.I.; Suzuki, M.; Vancanneyt, M.; Cleenwerck, I.; Lysenko, A.M.; Mikhailov, V.V.; Swings, J. (2004) *Zobellia amurskyensis* sp. nov., *Zobellia laminariae* sp. nov. and *Zobellia russellii* sp. nov., novel marine bacteria of the family Flavobacteriaceae. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 54, 1643-1648.
- Niku-Paavola, M. L.; Laitila, A.; Mattila-Sandholm, T.; Haikara, A. (1999) New types of antimicrobial compounds produced by *Lactobacillus plantarum*. *J Appl Microbiol.*, 86:29-35.
- Ohnishi, Y.; Ishikawa, J.; Hara, H.; Suzuki, H.; Ikenoya, M.; Ikeda, H.; Yamashita, A.; Hattori, M.; Horinouchi, S. (2008) Genome sequence of the streptomycin-producing microorganism *Streptomyces griseus* IFO 13350. *J Bacteriol.*, 190:4050-4060.
- Organização Mundial da Saúde (2012). *Meningococcal meningitis*. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs141/en/>>. Acesso em: 23 de set. 2014.
- Orlandini, V.; Maida, I.; Fondi, M.; Perrin, E.; Papaleo, M. C.; Bosi, E.; de Pascale, D.; Tutino, M. L.; Michaud, L.; Lo Giudice, A.; Fani, R. (2014) Genomic analysis of three sponge-associated *Arthrobacter* Antarctic strains, inhibiting the growth of *Burkholderia cepacia* complex bacteria by synthesizing volatile organic compounds. *Microbiological Research*, 169: 593-601.
- Paitan, Y.; Alon, G.; Orr, E.; Ron, E.Z.; Rosenberg, E. (1999) The first gene in the biosynthesis of the polyketide antibiotic TA of *Myxococcus xanthus* codes for a unique PKS module coupled to a peptide synthetase. *J. Mol. Biol.*, 286:465-474.
- Palleroni, N. J.; Bradbury, J. F. (1993) *Stenotrophomonas*, a New Bacterial Genus for *Xanthomonas maltophilia* (Hugh 1980). *Int J Syst Bacteriol.*, 3:606-609.
- Papa, R.; Parrilli, E.; Sannino, F.; Barbato, G.; Tutino, M. L.; Artini, M.; Selan, L.; (2013) Antibiofilm activity of the Antarctic marine bacterium *Pseudoalteromonas haloplanktis* TAC125. *Research In Microbiology*, 164: 450-456.
- Papaleo, M. C.; Romoli, R.; Bartolucci, G.; Maida, I.; Perrin, E.; Fondi, M.; Orlandini, V.; Mengoni, A.; Emiliani, G.; Tutino, M. L.; Parrilli, E.; Pascale, D.; Michaud, L.; Lo Giudice, A.; Fani, L. (2013) Bioactive volatile organic compounds from Antarctic (sponges) bacteria.
- Papaleo, M.C.; Fondi, M.; Maida, I.; Perrin, E.; Lo Giudice, A.; Michaud, L.; Mangano, S.; Bartolucci, G.; Romoli, R.; Fani, R. (2011) Sponge-associated microbial Antarctic

- communities exhibiting antimicrobial activity against *Burkholderia cepacia* complex bacteria. *Biotechnol Adv.* 30(1):272-93.
- Peck, L. S.; Convey, P.; Barnes, D. K. A. (2006) Environmental constraints on life histories in Antarctic ecosystems: tempos, timings and predictability. *Biological Reviews*, 81: 75–109.
- Pierson, L.S.; Pierson, E.A. (2010) Metabolism and function of phenazines in bacteria: impacts on the behavior of bacteria in the environment and biotechnological processes. *Appl Microbiol Biotechnol.* 86(6):1659-70.
- Pilet, M.; Dousset, X.; Barré, R.; Novel, G.; Desmazeaud, M.; Piard, J. (1995) Evidence for Two Bacteriocins Produced by *Carnobacterium piscicola* and *Carnobacterium divergens* Isolated from Fish and Active Against *Listeria monocytogenes*. *Journal of Food Protection*, 3: 229-344
- Pospiech A.; Neumann B. (1995). A versatile quick-prep of genomic DNA from Gram-positive bacteria. *Trends Genetics*, 11(6): 217-218.
- Procopio, R. E.; Silva, I. R.; Martins, M. K.; Azevedo, J.L.; Araújo, J. M. (2012) Antibiotics produced by *Streptomyces*. *Braz J Infect Dis*, 16: 466-471.
- Qin, S.; Chen, H. H.; Klenk, H. P.; Kim, C. J.; Xu, L. H.; Li, W. J. (2010) *Saccharopolyspora gloriosae* sp. nov., an endophytic actinomycete isolated from the stem of *Gloriosa superba* L. *Int J Syst Evol Microbiol.*,60: 1147-1151.
- Qin, S.; Li, J.; Chen, H.; Zhao, G.; Zhu, W.; Jiang, C.; Xu, L.; Li, W. (2009) Isolation, Diversity, and Antimicrobial Activity of Rare Actinobacteria from Medicinal Plants of Tropical Rain Forests in Xishuangbanna, China. *Appl. and Envir. Microbiol.* 75: 6176-6186.
- Reddy, G.S.N.; Matsumoto, G.I.; Schumann, P.; Stackebrandt, E.; Shivaji, S. (2004) Psychrophilic *Pseudomonas* from Antarctica: *Pseudomonas antarctica* sp. Nov., *Pseudomonas meridiana* sp. Nov. And *Pseudomonas proteolytica* sp. Nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 54: 713-719.
- Reddy, G.S.N.; Prakash, J.S.S.; Vairamani, M.; Prabhakar, S.; Matsumoto, G.I.; Shivaji, S. (2002) *Planococcus antarcticus* and *Planococcus psychrophilus* spp. Nov. Isolated from cyanobacterial mat samples collected from ponds in Antarctica. *Extremophiles*, 6: 253-261.
- Reeves, A. R.; Weber, G.; Cernota, W. H.; Weber, J. M. (2002) Analysis of an 8.1-kb DNA fragment contiguous with the erythromycin gene cluster of *Saccharopolyspora erythraea* in the eryCI-flanking region. *Antimicrob Agents Chemother.*, 46:3892-3899.
- Romanenko, L.A.; Uchino, M.; Tebo, B.M.; Tanaka, N.; Frolova, G.M.; Mikhailov, V.V. (2008) *Pseudomonas marincola* sp. Nov., isolated from marine environments. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 58: 706-710.
- Romoli, R.; Papaleo, M. C.; de Pascale, D.; Tutino, M. L.; Michaud, L.; LoGiudice, A.; Fani, R.; Bartolucci, G. (2011) Characterization of the volatile profile of Antarctic bacteria by using

- solid-phase microextraction-gas chromatography-mass spectrometry. *J Mass Spectrom.*, 46:1051-1059.
- Roth, E.; Schwenninger, S. M.; Eugster-Meier, E.; Lacroix, C. (2011) Facultative anaerobic halophilic and alkaliphilic bacteria isolated from a natural smear ecosystem inhibit *Listeria* growth in early ripening stages. *Int J Food Microbiol.*, 147:26-32.
- Saitou, N.; Nei, M. (1987) The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetics trees. *Mol. Biol. Evol.*, 21: 105-121.
- Salomon, C.E.; Magarvey, N.A.; Sherman, D.H. (2004) Merging the potential of microbial genetics with biological and chemical diversity: an even brighter future for marine natural product drug discovery. *Nat. Prod. Rep.*, 21:105–121.
- Sawabe, T.; Makino, H.; Tatsumi, M.; Nakano, K.; Tajima, K.; Iqbal, M.M.; Yumoto, I.; Ezura, Y.; Christen, R. (1998) *Pseudoalteromonas bacteriolytica* sp. Nov., a marine bacterium that is the causative agent of red spot disease of *Laminaria japonica*. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 48: 769-774.
- Scheuermayer, M.; Gulder, T.A.; Bringmann, G.; Hentschel, U. (2006) *Rubritalea marina* gen. nov., sp. nov., a marine representative of the phylum “Verrucomicrobia,” isolated from a sponge (Porifera). *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 56: 2119–2124.
- Schirmer, A.; Gadkari, R.; Reeves, C.D.; Ibrahim, F.; DeLong, E.F.; Hutchinson, C.R. (2005) Metagenomic analysis reveals diverse polyketide synthase gene clusters in microorganisms associated with the marine sponge *Discodermia dissoluta*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 71:4840–4849.
- Schwarzer, D.; Finking, R.; Marahiel, M. A. (2003) Nonribosomal peptides: from genes to products. *Nat Prod Rep.*; 20:275-87.
- Sfanos, K.; Harmody, D.; Dang, P.; Ledger, A.; Pomponi, S.; McCarthy, P.; Lopez, J. (2005) A molecular systematic survey of cultured microbial associates of deep-water marine invertebrates. *Systematic & Applied Microbiology*. 28: 242–264.
- Shivaji, S.; Chaturvedi, P.; Suresh, K.; Reddy, G.S.N.; Dutt, C.B.S.; Wainwright, M.; Narlikar, J.V.; Bhargava, P.M. (2006): *Bacillus aerius* sp. Nov., *Bacillus aerophilus* sp. Nov., *Bacillus stratosphericus* sp. Nov. And *Bacillus altitudinis* sp. Nov., isolated from cryogenic tubes used for collecting air samples from high altitudes. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 56: 1465-1473
- Shivaji, S.; Reddy, G.S.N.; Suresh, K.; Gupta, P.; Chintalapati, S.; Schumann, P.; Stackebrandt, E.; Matsumoto, G.I. (2005). *Psychrobacter vallis* sp. Nov. And *Psychrobacter aquaticus* sp. Nov., from Antarctica. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 55: 757-762.
- Simidu, U.; Kita-Tsukamoto, K.; Yasumoto, T.; Yotsu, M. (1990) Taxonomy of four marine bacterial strains that produce tetrodotoxin. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 40: 331-336.

- Smith, R.I.L. (2001) Plant colonization response to climate change in the Antarctic. *Folia Fac. Sci. Nat. Univ. Masarykianae Brunensis. Geographia*, 25, 19-33.
- Staunton, J.; Weissman, K. J. (2001) Polyketide biosynthesis: a millennium review. *Nat. Prod.*, 18: 380–416.
- Staunton, J.; Weissman, K.J. (2001) Polyketide biosynthesis: a millennium review. *Nat Prod Rep.*, 18: 380–416.
- Stibal, M.; Šabacká, M. ; Zárský, J. ( 2012) Biological processes on glacier and ice sheet surfaces. *Nature Geosciences*, 5: 771–774.
- Suthindhiran K.; Kannabiran, K. (2009) Cytotoxic and antimicrobial potential of actinomycete species *Saccharopolyspora salina* VITSDK4 isolated from the Bay of Bengal Coast of India. *Am. J. Infect. Dis.*,5:90–8.
- Tamura, K.; Dudley, J.; Masatoshi, N.; Sudhir Kumar, S. (2007) MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) Software Version 4.0. *Molecular Biology and Evolution*, 2(8): 1596-1599.
- Taylor, M.W.; Radax, R.; Steger, D.; Wagner, M. (2007) Sponge-Associated Microorganisms: Evolution, Ecology, and Biotechnological Potential. *Microbiology And Molecular Biology Reviews.*, 71 (2): 295–347.
- Thomas, D. N.; Fogg, G. E.; Convey, P.; Fritsen, C.H.; Gili, J. M.; Gradinger, R.; Laybourn-Parry, J.; Reid, K.; Walton. D. W. H. (2008) *The biology of polar regions*. Oxford University Press, Oxford, UK.
- Thompson, J.D.; Higgins D.J.; Gibson, T.J. (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position specific gap penalties & weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* 22: 4673–4680.
- Toffin, L.; Zink, K.; Kato, C.; Pignet, P.; Bidault, A.; Bienvenu, N.; Birrien, J.L.; Prieur D. (2005) *Marinilactibacillus piezotolerans* sp. nov., a novel marine lactic acid bacterium isolated from deep sub-seafloor sediment of the Nankai Trough. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 55: 345-351.
- Togashi, N.; Shiraishi, A.; Nishizaka, M.; Matsuoka, K.; Endo, K.; Hamashima, H.; Inoue, Y. (2007) Antibacterial activity of long-chain fatty alcohols against *Staphylococcus aureus*. *Molecules*, 12:139-48.
- Treasure, A. M.; Chown, S. L. (2013) Contingent absences account for range limits but not the local abundance structure of an invasive springtail. *Ecography*, 36: 146–156.
- Tulini, F. L.; De Martinis, E.C.P. (2010) Improved adsorption-desorption extraction applied to the partial characterization of the antilisterial bacteriocin produced by *Carnobacterium maltaromaticum* C2. *Braz. J. Microbiol.* 41: 493-496.

- Unciti-Broceta, J. D.; Maceira, J.; Morales, S.; García-Pérez, A.; Muñoz-Torres, M. E.; Garcia-Salcedo, J. A. Nicotinamide inhibits the lysosomal cathepsin b-like protease and kills African trypanosomes. *J Biol Chem.*, 288:10548-10557.
- USFDA (2008) U.S. National Archives and Records Administration's Electronic Code of Federal Regulations. Disponível em: <<http://www.gpoaccess.gov/ecfr>>. Acesso em: 23 de out. 2014.
- Van Trappen, S.; Vandecandelaere, I.; Mergaert, J.; Swings, J. (2004). *Algoriphagus antarcticus* sp. Nov., a novel psychrophile from microbial mats in Antarctic lakes. *Int.J. Syst. Evol. Microbiol.*, 54: 1969-1973.
- Walsh, C. T. (2004). Polyketide and nonribosomal peptide antibiotics: modularity and versatility. *Science*, 303: 1805–1810.
- Wang, Z.; Wang, C.; Li, F.; Li, Z.; Chen, M.; Wang, Y.; Qiao, X.; Zhang, H. (2013) Fumigant activity of volatiles from *Streptomyces alboflavus* TD-1 against *Fusarium moniliforme* Sheldon. *J Microbiol.*, 51:477-83.
- Watve, M. G.; Tickoo, R.; Jog, M. M.; Bhole, B. D. (2001) How many antibiotics are produced by the genus *Streptomyces*? *Arch Microbiol.*, 176:386-390.
- Webster, N.S.; Bourne, D. (2007) Bacterial community structure associated with the Antarctic soft coral, *Alcyonium antarcticum*. *FEMS Microbiol Ecol.* 59: 81–94.
- Webster, N.S.; Hill, R.T. (2001) The culturable microbial community of the Great Barrier Reef sponge *Rhopaloeides odorabile* is dominated by an -proteobacterium. *Mar. Biol.* 138: 843–851.
- Webster, N.S.; Negri, A.P.; Munro, M.M.; Battershill, C.N. (2004) Diverse microbial communities inhabit Antarctic sponges. *Environ. Microbiol.* 6: 288–300.
- Webster, N.S.; Watts, J.E.; Hill, R.T. (2001) Detection and phylogenetic analysis of novel crenarchaeote and euryarchaeote 16S ribosomal RNA gene sequences from a Great Barrier Reef sponge. *Mar. Biotechnol.* 3: 600– 608.
- Wietz, M.; Mansson, M.; Bowman, J. S.; Blom, N.; Ng, Y.; Grama, L. (2012) Wide Distribution of Closely Related, Antibiotic-Producing Arthrobacter Strains throughout the Arctic Ocean. *Appl. and Envir. Microbiol.* 78: 2039–2042.
- Wolf, A.; Fritze, A.; Hagemann, M.; Berg, G (2002) *Stenotrophomonas rhizophila* sp. nov., a novel plant-associated bacterium with antifungal properties. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 52, 1937-1944.
- Xin, Y. J.; Kanagasabhapathy, M.; Janussen, D.; Xue, S.; Zhang, W. (2011) Phylogenetic diversity of Gram-positive bacteria cultured from Antarctic deep-sea sponges. *Polar Biology*, 34: 1501-1512.

- Yao, P. L.; Lin, Y. C.; Richburg, J. H. (2012) Mono-(2-Ethylhexyl) Phthalate (MEHP) Promotes Invasion and Migration of Human Testicular Embryonal Carcinoma Cells . *Biology of Reproduction*, 86:1-10.
- Ye, Y.; Li, J.B.; Ye, D. Q.; Jiang, Z. J. (2006) *Enterobacter* bacteremia: Clinical features, risk factors for multiresistance and mortality in a Chinese University Hospital. *Infection*, 34:252-257.
- Yoon , J.; Urban, C.; Terzian, C.; Mariano N.; Rahal, J. (2004) In vitro double and triple synergistic activities of Polymyxin B, imipenem, and rifampin against multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *J. Antimicrob Agents Chemother.*, 48:753-7.
- Yumoto, I.; Yamazaki, K.; Hishinuma, M.; Nodasaka, Y.; Suemori, A.; Nakajima, K.; Inoue, N.; Kawasaki, K. (2001) *Pseudomonas alcaliphila* sp. Nov., a novel facultatively psychrophilic alkaliphile isolated from seawater. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 51: 349-355.
- Zhang, D.C.; Liu, H.C.; Xin, Y.H.; Yu, Y.; Zhou, P.J.; Zhou Y.G. (2008): *Salinibacterium xinjiangense* sp. Nov., a psychrophilic bacterium isolated from the China No. 1 glacier. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 58: 2739-2742.
- Zhang, S.; Koh, T. H.; Seah, W. K.; Lai, Y. H.; Elgar, M. A.; Li, D. (2011) A novel property of spider silk: chemical defence against ants. *Proc Roy Soc B*, 282.
- Zhao, H. L.; Yang, J.; Chen, X. L.; Su, H. N.; Zhang, X. Y.; Huang, F.; Zhou, B. C.; Xie, B. B. (2014) . Optimization of fermentation conditions for the production of the M23 protease Pseudoalterin by deep-sea *Pseudoalteromonas* sp. CF6-2 with artery powder as an inducer. *Molecules*, 19:4779-4790.
- Zucko, J.; Skunca, N.; Curk, T.; Zupan, B.; Long, P. F.; Cullum, J.; Kessin, R. H.; Hranueli, D. (2007) Polyketide synthase genes and the natural products potential of *Dictyostelium discoideum*. *Bioinformatics* , 23: 2543–2549.

**ANEXO I.** Descrição das características morfológicas, presença de genes e identificação em nível de gênero dos isolados.

Código	Gênero	Presença dos genes PKS-I e/ou PKS-II e/ou NRPS	Forma	Coloração de Gram
ANT_B1	<i>Psychrobacter</i>	+	Bastonete	Negativo
ANT_B2	<i>Pseudoalteromonas</i>	-	Bastonete	Negativo
ANT_B3	<i>Marinobacter</i>	+	Bastonete	Negativo
ANT_B4	<i>Psychrobacter</i>	+	Cocobacilo	Negativo
ANT_B5	<i>Pseudomonas</i>	+	Bastonete	Negativo
ANT_B6	<i>Pseudoalteromonas</i>	+	Bastonete	Negativo
ANT_B7	<i>Psychrobacter</i>	-	Bastonete	Negativo
ANT_B8	<i>Psychrobacter</i>	+	Bastonete	Negativo
ANT_B9	<i>Marinobacter</i>	+	Bastonete	Negativo
ANT_B10	<i>Zobellia</i>	+	Bastonete	Negativo
ANT_B11	<i>Marinobacter</i>	+	Bastonete	Negativo
ANT_B12	<i>Planococcus</i>	+	Cocos	Positivo
ANT_B13	<i>Psychrobacter</i>	-	Bastonete	Negativo
ANT_B14	<i>Psychrobacter</i>	+	Cocobacilo	Negativo
ANT_B15	<i>Psychrobacter</i>	-	Cocobacilo	Negativo
ANT_B16	<i>Psychrobacter</i>	+	Cocobacilo	Negativo
ANT_B17	<i>Pseudoalteromonas</i>	+	Bastonete	Negativo
ANT_B18	<i>Psychrobacter</i>	+	Cocobacilo	Negativo
ANT_B19	<i>Planococcus</i>	+	Cocobacilo	Positivo
ANT_B20	<i>Psychrobacter</i>	+	Cocobacilo	Negativo
ANT_B21	<i>Psychrobacter</i>	-	Bastonete	Negativo
ANT_B22	<i>Bacillus</i>	-	Bastonete	Positivo
ANT_B23	<i>Enterobacter</i>	-	Bastonete	Negativo
ANT_B24	<i>Psychrobacter</i>	-	Cocobacilo	Negativo
ANT_B25	<i>Enterobacter</i>	-	Bastonete	Negativo
ANT_B26	<i>Psychrobacter</i>	-	Cocobacilo	Negativo
ANT_B27		-	Bastonete	Negativo
ANT_B28		-	Bastonete	Negativo
ANT_B29	<i>Psychrobacter</i>	+	Bastonete	Negativo
ANT_B30	<i>Zobellia</i>	-	Bastonete	Negativo
ANT_B31	<i>Psychrobacter</i>	+	Bastonete	Negativo
ANT_B32	<i>Psychrobacter</i>	+	Cocobacilo	Negativo
ANT_B33	<i>Planococcus</i>	+	Cocobacilo filamentoso	Positivo
ANT_B34	<i>Psychrobacter</i>	+	Bastonete	Negativo
ANT_B35	<i>Planococcus</i>	+	Cocobacilo	Positivo

ANT_B36	<i>Psychrobacter</i>	+	Bastonete	Negativo
ANT_B38	<i>Marinomonas</i>	+	Bastonete	Negativo
ANT_B39	<i>Psychrobacter</i>	+	Cocobacilo	Negativo
ANT_B40	<i>Escherichia</i>	+	Bastonete	Negativo
ANT_B41	<i>Psychrobacter</i>	+	Bastonete	Negativo
ANT_B42	<i>Escherichia</i>	+	Bastonete	Negativo
ANT_B43	<i>Escherichia</i>	+	Bastonete	Negativo
ANT_B44	<i>Thalassomonas</i>	+	Bastonete	Negativo
ANT_B45	<i>Pseudoalteromonas</i>	+	Cocobacilo	Negativo
ANT_B46	<i>Pseudoalteromonas</i>	+	Cocobacilo	Negativo
ANT_B47	<i>Marinobacter</i>	+	Bastonete	Negativo
ANT_B48	<i>Brevibacterium</i>	+	Bastonete	Positivo
ANT_B49	<i>Shewanella</i>	+	Bastonete	Negativo
ANT_B50	<i>Stenotrophomonas</i>	+	Bastonete	Negativo
ANT_B51	<i>Psychrobacter</i>	+	Bastonete	Negativo
ANT_B52	<i>Pseudoalteromonas</i>	+	Bastonete	Negativo
ANT_B53	<i>Pseudoalteromonas</i>	+	Bastonete	Negativo
ANT_B54	<i>Pseudomonas</i>	+	Bastonete	Negativo
ANT_B55	<i>Planococcus</i>	-	Cocos	Positivo
ANT_B56	<i>Planococcus</i>	+	Cocos	Positivo
ANT_B57	<i>Enterobacter</i>	+	Bastonete	Negativo
ANT_B58		-	Cocos	Positivo
ANT_B59	<i>Kocuria</i>	-	Cocos	Positivo
ANT_B60	<i>Pantoea</i>	+	Cocos	Positivo
ANT_B61	<i>Planococcus</i>	+	Bastonete filamentoso	Positivo
ANT_B62	<i>Psychrobacter</i>	+	Diplococos	Negativo
ANT_B63	<i>Planococcus</i>	+	Cocobacilo	Positivo
ANT_B64			Cocobacilo	Negativo
ANT_B65	<i>Marinilactibacillus</i>	+	Bastonete	Positivo
ANT_B66	<i>Enterobacter</i>	+	Bastonete	Negativo
ANT_B67	<i>Psychrobacter</i>	-	Bastonete	Negativo
ANT_B68	<i>Shewanella</i>	+	Bastonete	Negativo
ANT_B69	<i>Dietzia</i>	+	Cocos	Positivo
ANT_B70	<i>Enterobacter</i>	+	Bastonete	Negativo
ANT_B71	<i>Psychrobacter</i>	+	Bastonete	Negativo
ANT_B72	<i>Enterobacter</i>	+	Diplococos	Negativo
ANT_B73	<i>Psychrobacter</i>	+	Bastonete	Negativo
ANT_B74	<i>Sulfitobacter</i>	+	Cocobacilo	Negativo
ANT_B75		+		
ANT_B76	<i>Pseudoalteromonas</i>	+	Bastonete	Negativo
ANT_B77	<i>Marinomonas</i>		Bastonete	Negativo

ANT_B78	<i>Psychrobacter</i>	+	Bastonete	Negativo
ANT_B79	<i>Psychrobacter</i>	+	Bastonete	Negativo
ANT_B80	<i>Arthrobacter</i>	+	Bastonete	Positivo
ANT_B81	<i>Pseudoalteromonas</i>	+	Cocos	Negativo
ANT_B82	<i>Planococcus</i>	+	Bastonete	Positivo
ANT_B83	<i>Psychrobacter</i>	+	Cocos	Negativo
ANT_B84	<i>Psychrobacter</i>	+	Bastonete	Negativo
ANT_B85	<i>Salinibacterium</i>	+	Cocus	Positivo
ANT_B86	<i>Psychrobacter</i>	+	Bastonete	Negativo
ANT_B87	<i>Carnobacterium</i>	-	Cocobacilo	Negativo
ANT_B88	<i>Marinobacter</i>	+	Bastonete	Negativo
ANT_B89	<i>Pseudomonas</i>	+	Bastonete	Negativo
ANT_B90	<i>Salinibacterium</i>	+	Cocus	Positivo
ANT_B91	<i>Marinobacter</i>	+	Bastonete	Negativo
ANT_B92	<i>Sulfitobacter</i>	+	Cocobacilo	Negativo
ANT_B93	<i>Psychrobacter</i>	+	Bastonete	Negativo
ANT_B94	<i>Marinilactibacillus</i>	+	Bastonete	Positivo
ANT_B95	<i>Carnobacterium</i>	+	Bastonete filamentoso	Negativo
ANT_B96	<i>Zobellia</i>	+	Bastonete	Positivo
ANT_B97	<i>Psychrobacter</i>	+	Bastonete filamentoso	Negativo
ANT_B98		-		
ANT_B99	<i>Bacillus</i>	+	Bastonete	Positivo
ANT_B100	<i>Curtobacterium</i>	+	Bastonete filamentoso	Positivo
ANT_B101				
ANT_B102	<i>Pseudomonas</i>		Bastonete	Negativo
ANT_B103	<i>Rhodococcus</i>	+	Bastonete	Negativo
ANT_B104	<i>Brevibacterium</i>	+	Bastonete	Positivo
ANT_B105	<i>Marinilactibacillus</i>	+	Bastonete	Negativo
ANT_B106	<i>Carnobacterium</i>	+	Bastonete	Negativo
ANT_B107	<i>Marinilactibacillus</i>	+	Bastonete / filamentoso	Positivo
ANT_B108	<i>Carnobacterium</i>	+	Bastonete filamentoso	Negativo
ANT_B109	<i>Psychrobacter</i>	+	Bastonete filamentoso	Negativo
ANT_B110	<i>Psychrobacter</i>	+	Bastonete	Negativo
ANT_B111	<i>Algoriphagus</i>	+	Bastonete	Negativo
ANT_B112	<i>Planococcus</i>	+	Bastonete filamentoso	Positivo
ANT_B113	<i>Pseudomonas</i>	+	Cocos	Negativo
ANT_B114	<i>Planococcus</i>	+	Bastonete	Positivo
ANT_B115	<i>Marinilactibacillus</i>	+	cocos	Positivo
ANT_B116	<i>Marinomonas</i>	+	Bastonete / filamentoso	Negativo
ANT_B117		+	Bastonete	Negativo

ANT_B118	<i>Marinilactibacillus</i>		Bastonete	Positivo
ANT_B119	<i>Psychrobacter</i>	+	Bastonete	Negativo
ANT_B120	<i>Shewanella</i>	+	Bastonete	Negativo
ANT_B121	<i>Psychrobacter</i>	+	Bastonete	Negativo
ANT_B122	<i>Salinibacterium</i>	+	Bastonete	Positivo
ANT_B123	<i>Psychrobacter</i>	+	Bastonete	
ANT_B124	<i>Enterobacter</i>	+	Bastonete	Negativo
ANT_B125	<i>Bacillus</i>	+	Bastonete	Positivo
ANT_B126	<i>Stenotrophomonas</i>	+	Bastonete	Negativo
ANT_B127		+		
ANT_B128	<i>Streptomyces</i>	+	Cocos filamentoso	Positivo
ANT_B129	<i>Staphylococcus</i>	+	cocos	Positivo
ANT_B130	<i>Saccharopolyspora</i>	+	Coco filamentoso	Positiva
ANT_B131	<i>Streptomyces</i>	+	Cocos filamentoso	Positivo
ANT_B132	<i>Staphylococcus</i>	+	Cocos e Estreptococos	Positiva
ANT_B133	<i>Nocardiopsis</i>	+	Bastonete	Positiva
ANT_B134		+		
ANT_B135			Bastonete filamentoso	Positivo
ANT_B136	<i>Saccharopolyspora</i>	+	Coco filamentoso	Positiva
ANT_B137		+		
ANT_B138	<i>Streptomyces</i>		Cocos filamentoso	Positivo
ANT_B139	<i>Micrococcus</i>	+	Diplococos	Positivo
ANT_B140	<i>Pseudomonas</i>	-	Bastonete	Negativo
ANT_B141	<i>Pseudomonas</i>	+	Bastonete	Negativo
ANT_B142	<i>Pseudomonas</i>	+	Bastonete	Negativo
ANT_B143	<i>Pseudomonas</i>	+	Bastonete	Negativo
ANT_B144	<i>Pseudomonas</i>	+	Bastonete	Negativo
ANT_B145	<i>Pseudomonas</i>	+	Bastonete	Negativo
ANT_B146	<i>Pseudomonas</i>	+	Bastonete	Negativo
ANT_B147	<i>Pseudomonas</i>	+	Bastonete	Negativo
ANT_B148	<i>Pseudomonas</i>	+	Bastonete	Negativo
ANT_B149	<i>Pseudomonas</i>	+	Bastonete	Negativo
ANT_B150	<i>Pseudomonas</i>	+	Bastonete	Negativo
ANT_B151	<i>Pseudomonas</i>	+	Bastonete	Negativo
ANT_B152	<i>Pseudomonas</i>	+	Bastonete	Negativo
ANT_B153	<i>Pseudomonas</i>	+	Bastonete	Negativo

**ANEXO II.** Compostos identificados através de Cromatografia Gasosa acoplada ao espectômetro de massas dos extratos brutos obtidos de bactérias da Antártica e a atividade antimicrobiana associada aos compostos.

<b>Extrato bruto</b>	<b>Composto químico</b>	<b>Atividade antimicrobiana descrita na literatura</b>
<b>E5, E61, E114, E128, E144, E146</b>	1,4-benzenodiamina,N-(1-metiletil)-N'-fenil	Ezhilan; Neelamegan, 2012
<b>E6, E46</b>	13-metil-oxaciclotetradecano-2,11-diona	Atividade antimicrobiana não é conhecida
<b>E131</b>	1-Ciclohepteno-1,4-dimetil-3-(2-metil-1-propeno-1-il)-4-vinil	Atividade antimicrobiana não é conhecida
<b>E136</b>	1-etanol,2-(2-butoxi-etoxi)-	Atividade antimicrobiana não é conhecida
<b>E50</b>	1-hexadecanol	Togashi et al., 2007
<b>E38</b>	1H-Indol,2,3-dihidro-4-metil	Atividade antimicrobiana não é conhecida
<b>E61, E114</b>	2(1H)-piridiona,3-metil-	Atividade antimicrobiana não é conhecida
<b>E5, E38, E53, E61, E65, E76, E111, E114, E118, E128, E131, E136, E144, E146</b>	2,4-imidazolidinadiona,5-metil-	Niku-Paavola et al, 1999
<b>E111</b>	2,5-piperazinadiona,3,6-bis(2-metilpropil)-	Atividade antimicrobiana não é conhecida
<b>E144, E146</b>	2-aminofenol	Hossain et al, 2004
<b>E44,</b>	2H-indol-2-one-1,3-dihidro	Akhaja; Raval, 2011
<b>E136</b>	2-pirrolidiona	Atividade antimicrobiana não é conhecida
<b>E131</b>	3-benzene,1-(5,5-dimetil-1-ciclopenteno-1-il)	Atividade antimicrobiana não é conhecida

<b>E38, E76</b>	3-piridinacarboxamida	Unceti-Broceta et al., 2013
<b>E114</b>	5,6-dihidro-6-metiluracil	Atividade antimicrobiana não é conhecida
<b>E146</b>	Ácido 1,2-benzenedicarboxílico mono(2-etilhexil)éster	Atividade antimicrobiana não é conhecida
<b>E38</b>	Ácido 11-heptadecanóico	Agoramoorthy et al., 2007
<b>E38, E46</b>	Ácido 9-hexadecanóico	Zhong-hui et al.,2010; Chen et al., 2011; Choi et al., 2013
<b>E46</b>	Ácido 9-octadecenóico	Zhong-hui et al.,2010; Chen et al., 2011; Choi et al., 2013
<b>E136</b>	Ácido decanedióico bis(2-etilhexil) éster	Atividade antimicrobiana não é conhecida
<b>E144</b>	Ácido ftálico, isobutil octiléster	Atividade antimicrobiana não é conhecida
<b>E136</b>	Ácido heptadecanóico	Agoramoorthy et al., 2007
<b>E6, E38, E46, E50, E111, E128, E131, E136, E144</b>	Ácido n-hexadecanóico	Zhong-hui et al.,2010; Chen et al., 2011; Choi et al., 2013
<b>E38</b>	Ácido octadecanóico	Zhong-hui et al.,2010; Chen et al., 2011; Choi et al., 2013
<b>E6, E38, E46, E50, E111, E131, E136</b>	Ácido pentadecanóico	Agoramoorthy et al, 2007
<b>E131, E136</b>	Ácido tetradecanóico	Agoramoorthy et al., 2007
<b>E136</b>	Ácido tridecanóico	Agoramoorthy et al., 2007
<b>E44, E50, E76, E111, E131, E146</b>	Ácido Z-11-hexadecanóico	Zhong-hui et al.,2010; Chen et al., 2011; Choi et al., 2013
<b>E50</b>	Ácido Z-11-tetradecanóico	Agoramoorthy et al., 2007
<b>E6, E46, E44</b>	Ácido Z-7-hexadecanóico	Zhong-hui et al.,2010; Chen et al., 2011; Choi et al., 2013
<b>E144</b>	Benzenamina,4,4'-(1,2-etenodil)bis-	Atividade antimicrobiana não é conhecida

<b>E111</b>	Ciclohexano-1-(ciclohexilmetil)2-etil-,trans-metil	Atividade antimicrobiana não é conhecida
<b>E114</b>	Dietil ftalato	Islam et al., 2013
<b>E144</b>	Enxofre octaatômico cíclico	Atividade antimicrobiana não é conhecida
<b>E61, E114, E144, E146</b>	Etanol, 2-(2-butoxietoxi)-	Atividade antimicrobiana não é conhecida
<b>E61, E114</b>	Feniletil álcool	Fialho et al., 2011
<b>E53, E136, E144</b>	Fenol-2,4-bis(1-metil-1-feniletil)	Atividade antimicrobiana não é conhecida
<b>E65</b>	o-ciclopentil S-2(diisopropilamino)etil metilfosfonotiolato	Atividade antimicrobiana não é conhecida
<b>E38</b>	Oxaciclotetradecano-2-ona	Dongfei et al., 2002
<b>E131, E136</b>	Trans-1,10-dimetil-tras-9-decalinol	Nakajima et al., 1996; Dionigi et al., 1993