

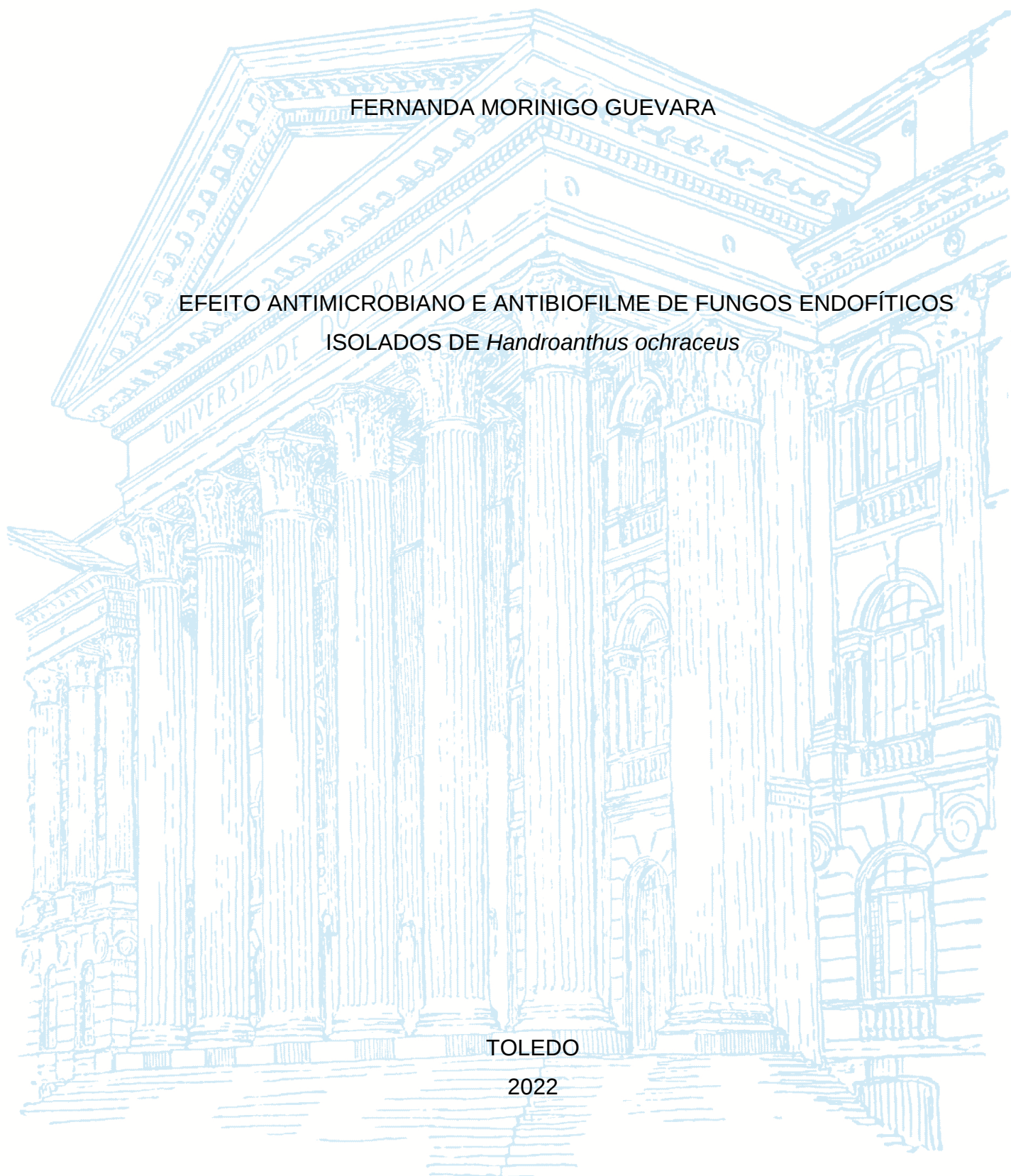
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

FERNANDA MORINIGO GUEVARA

EFEITO ANTIMICROBIANO E ANTIBIOFILME DE FUNGOS ENDOFÍTICOS
ISOLADOS DE *Handroanthus ochraceus*

TOLEDO

2022



FERNANDA MORINIGO GUEVARA

EFEITO ANTIMICROBIANO E ANTIBIOFILME DE FUNGOS ENDOFÍTICOS
ISOLADOS DE *Handroanthus ochraceus*

Trabalho de curso apresentado ao curso de medicina da Universidade Federal do Paraná-Campus Toledo, como requisito parcial de obtenção do título de Bacharel em Medicina.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Juliana Bernardi Wenzel.

TOLEDO
2022

Dedico este Trabalho de Curso ao meu amado avô Daniel Morinigo (*in memoriam*), o qual foi um dos meus maiores incentivadores em toda a minha caminhada. Sua pessoa e seus conselhos de vida jamais serão esquecidos.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por me capacitar, me sustentar, renovar minhas forças e sempre encher meu coração de fé, alegria e gratidão.

Aos meus maravilhosos pais, por sempre me mostrarem que sou capaz de ir além do que eu imagino, acreditarem no meu potencial e por serem a minha fortaleza na Terra.

À toda a minha família, por estar sempre orando e torcendo por mim, mesmo a quilômetros de distância.

Às minhas amigas, que sempre ajudaram a tornar o fardo mais leve nas horas difíceis.

Aos meus companheiros de Iniciação Científica, pela companhia na caminhada.

À minha orientadora, Prof^a. Dr^a. Juliana Bernardi Wenzel, por toda paciência e todos os ensinamentos durante os anos em que trabalhamos juntas.

“A felicidade e as bactérias têm uma coisa
em comum: elas se multiplicam dividindo!”

(Rutvik Oza)

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	9
2 ARTIGO	11
3 CONSIDERAÇÕES FINAIS	28
4 REFERÊNCIAS	29
ANEXO 1 – NORMAS DA REVISTA	31

1 INTRODUÇÃO

Os microrganismos são ubíquos e podem viver em diferentes locais e combinações na natureza, bem como em dispositivos. Endofíticos são aqueles que habitam o interior de tecidos de plantas, sem causar danos aparentes aos hospedeiros ou estruturas externas visíveis, sendo encontrados nas folhas, ramos e raízes (AZEVEDO et al., 2000; NETO et al., 2002; CHALLIS e HOPWOOD, 2003). Essa relação pode ser vantajosa para a planta, já que o endófito pode secretar metabólitos biologicamente ativos que garantem proteção do hospedeiro contra fitopatógenos (ZHANG et al., 2006; SUDHA et al., 2016).

Dentre os microrganismos endofíticos, os fungos são de grande interesse para a comunidade científica, devido à produção de metabólitos secundários com aplicações na indústria farmacêutica (STROBEL; DAISY, 2003). As várias substâncias produzidas por fungos endofíticos podem possuir ações hormonais, antibióticas, antitumorais, antivirais, antiparasitárias, entre outras (NETO et al., 2002; DEMAINE e SANCHEZ, 2009).

Outro tipo de interação entre os microrganismos ocorre na formação de biofilmes, na qual crescem em comunidades anexados a uma superfície e incorporados em uma matriz extracelular autoproduzida (DONLAN, 2001). Essas comunidades podem colonizar dispositivos médicos como cateteres, marcapassos cardíacos, próteses articulares, próteses cardíacas e válvulas, causando várias infecções no organismo (DAROUCHE, 2004; DONLAN, 2001).

Tais comunidades protegem as bactérias invasoras contra o sistema imunológico do hospedeiro por ativação de fagócitos e sistema complemento e aumentam sua resistência a antibióticos convencionais em cerca de 1000 vezes (GEBREYOHANNES et al., 2019).

Nesse cenário de aumento da resistência dos microrganismos às drogas existentes, pesquisas têm buscado opções terapêuticas (STROBEL; DAISY, 2003). De acordo com Hongsheng et al. (2010), a busca por compostos obtidos de fungos endofíticos pode ser uma área promissora na tentativa de combater tal problema.

Os biofilmes são clinicamente importantes na patogênese de inúmeras infecções bacterianas que são difíceis de serem controladas com o uso de antibióticos (COSTERTON et al., 1999), causando quadros crônicos, nos quais as infecções persistem apesar da antibioticoterapia aparentemente adequada

(GOMINET et al., 2017). Além dos impactos ao paciente, tal resistência também implica em altos custos para o sistema de saúde (GUPTA et al., 2019).

Além de estarem envolvidos em infecções crônicas, os biofilmes podem se desenvolver em dispositivos médicos de permanência, como lentes de contato, cateteres venosos centrais, válvulas cardíacas mecânicas, cateteres de diálise peritoneal, articulações protéticas, marcapassos, cateteres urinários e próteses vocais (JAMAL et al., 2018).

Estima-se que até 60% das infecções humanas sejam devido aos biofilmes (ENGELKIRK; ENGELKIRK, 2012). Sob esse aspecto, de acordo com Gebreyohannes et al. (2019), há relatos de que, para tratar e erradicar biofilmes patogênicos de pacientes, sejam necessárias doses 10-1000 vezes maiores de antibióticos do que cepas idênticas que vivem em forma planctônica, o que pode ser tóxico para o paciente.

Nesse contexto, segundo a Organização Mundial da Saúde, a resistência aos antibióticos é desafio global complexo à saúde pública. No cuidado secundário, a resistência aos antibióticos aumenta o tempo de internação hospitalar, mortalidade e custos (GEBREYOHANNES et al., 2019).

Tendo em vista a limitação das terapias antibióticas convencionais em combater infecções causadas por biofilmes bacterianos e suas consequências, tanto no aspecto da saúde quanto no econômico, fica evidente a importância do estudo de novos mecanismos químicos para combater a formação de biofilmes. Visando tal resultado, pretendeu-se verificar se compostos produzidos por fungos endofíticos isolados de flores de *Handroanthus ochraceus* apresentam potencial para inibir a formação de biofilmes.

Diante do exposto, a busca por um tratamento alternativo ou suplementar contra os biofilmes bacterianos é necessária. A pesquisa de compostos naturais, como os obtidos de plantas medicinais, é uma área promissora, devido à sua capacidade de aumentar a eficácia das terapias convencionais existentes (ZHANG et al., 2020). A avaliação do potencial antibiofilme de endofíticos de *H. ochraceus* se encaixa nesse cenário.

Assim, este trabalho objetivou avaliar o efeito antimicrobiano e antibiofilme de compostos obtidos de fungos endofíticos isolados de *Handroanthus ochraceus* contra a bactéria *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

2 ARTIGO

O presente estudo foi realizado em formato de artigo conforme deliberação da Comissão de Trabalho de Curso da UFPR – Campus Toledo e será submetido à Revista American Journal of Infection Control, com o título: Efeito antimicrobiano e anti-biofilme de endofíticos isolados de *Handroanthus ochraceus*.

Efeito antimicrobiano e anti-biofilme de fungos endofíticos isolados de *Handroanthus ochraceus*

Fernanda Morinigo Guevara^a, Juliana Bernardi-Wenzel^b

^aDiscente do curso de Medicina – Universidade Federal do Paraná – Campus Toledo, Brasil; Federal University of Paraná, Toledo, PR (Rodovia Pr 182 - S/N Km 320/321 Cep 85919-899, Toledo - PR, Brazil). Telefone: +55 (67) 996160983; E-mail: fernanda.morinigo@ufpr.br.

^bDocente do curso de Medicina – Universidade Federal do Paraná – Campus Toledo, Brasil. Federal University of Paraná, Toledo, PR (Rodovia Pr 182 - S/N Km 320/321 Cep 85919-899, Toledo - PR, Brazil). Doutora em Biologia das Interações Orgânicas; Telefone: +55 (45) 999570927; E-mail: julianawenzel@ufpr.br.

RESUMO:

Introdução: As plantas medicinais têm sido usadas para alívio de enfermidades e, atualmente, têm sido alvo de pesquisas para investigar os responsáveis por essa ação medicamentosa. Sabe-se que grande parte dessa ação se deve ao metabolismo de endófitos, em especial os fungos. **Objetivos:** avaliar a ação antimicrobiana, pela determinação da concentração inibitória mínima (CIM), e a capacidade de evitar a formação e erradicar biofilmes, de compostos obtidos de fungos endofíticos isolados de *Handroanthus ochraceus* (ipê-amarelo) contra a bactéria *S. aureus* ATCC 25923. **Material e Métodos:** No presente estudo, fungos endofíticos foram obtidos da planta *Handroanthus ochraceus* e deles obtidos metabólitos secundários, que foram solubilizados em fases com polaridades distintas (aquosa, em clorofórmio e em acetato de etila). Cada fase foi avaliada quanto ao seu potencial antimicrobiano, por meio da CIM, e anti-biofilme contra a bactéria. **Resultados:** Dos 33 compostos testados, 8 apresentaram efeitos antimicrobianos, sendo 5 em clorofórmio e 3 em acetato de etila. Os compostos de clorofórmio foram mais promissores, apresentando maiores efeitos bactericidas e maior inibição da formação de biofilme. A capacidade de erradicar os biofilmes foi inferior à de inibir sua formação, provavelmente devido a características intrínsecas de sua estrutura. **Conclusão:** Os resultados encontrados podem ser considerados promissores e servir de base para estudos adicionais.

Palavras-chave: biofilmes, infecções por cateteres, Gram-positivo, *Staphylococcus aureus*, metabólitos secundários.

INTRODUÇÃO:

Ao longo dos séculos, populações de todos os países têm buscado, nas plantas, cura de enfermidades, alívio de dores e controle de pragas¹. Originalmente utilizadas pelo conhecimento popular, elas têm sido estudadas e se tornado uma fonte importante de produtos naturais biologicamente ativos, que podem resultar na descoberta de novos fármacos para diversos fins terapêuticos. Atualmente, tem-se considerado que grande parte dessa ação medicamentosa das plantas medicinais é devida ao metabolismo secundário de microrganismos endofíticos².

Microrganismos endofíticos são aqueles que habitam o interior de tecidos de plantas, sem causar danos aparentes aos hospedeiros ou estruturas externas visíveis, sendo representados, principalmente, por bactérias e fungos^{3,4}. Essa interação microrganismo-hospedeiro, no geral, é vantajosa para ambos, tendo em vista que os endófitos recebem nutrientes e compostos necessários para sua sobrevivência⁵.

Nesta simbiose, a planta é beneficiada devido à produção de hormônios de crescimento pelo endófito, os quais atuam potencializando o desenvolvimento da sua hospedeira. Além disso, os endófitos produzem diversos metabólitos secundários que podem ser bioativos, tais como alcaloides, terpenos, flavonoides e isoflavonoides, os quais conferem maior proteção à planta hospedada⁶. Alguns fungos são capazes, inclusive, de produzir metabólitos idênticos aos da planta que os abriga, provavelmente devido a um processo de recombinação genética durante a evolução, uma co-evolução⁷.

As várias classes de moléculas produzidas por fungos endofíticos têm sido estudadas quanto às suas atividades hormonais, antitumorais, antifúngicas, citotóxicas, antivirais, imunossupressoras, antibióticas, entre outras⁸. Em relação à atividade antimicrobiana dessas moléculas, destacam-se os flavonoides, alcaloides e compostos fenólicos, que apresentam potencial no controle de diferentes tipos de microrganismos, incluindo bactérias patogênicas gram-positivas e gram-negativas⁹.

Entre as bactérias potencialmente patogênicas a humanos, está a espécie gram-positiva *Staphylococcus aureus*, que está normalmente presente na pele e nas narinas humanas sem causar doença. No entanto, trata-se de um patógeno oportunista, sendo capaz de gerar infecções quando em condições propícias e levar a doenças de pele e outras como pneumonia, endocardite e bacteremia¹⁰. Além disso, *S. aureus* também está envolvida no desenvolvimento de infecções crônicas,

devido à formação de biofilmes em dispositivos médicos, tais como cateteres, próteses e válvulas cardíacas artificiais¹¹.

Esses biofilmes são comunidades de microrganismos que crescem anexados a uma superfície e incorporados em uma matriz extracelular autoproduzida¹². Tais comunidades protegem as bactérias invasoras contra o sistema imunológico do hospedeiro por ativação de fagócitos e sistema complemento e aumentam sua resistência a antibióticos convencionais em cerca de 1000 vezes¹³.

Nesse cenário de aumento da resistência dos microrganismos às drogas existentes, novas opções terapêuticas são necessárias. A busca por compostos obtidos de fungos endofíticos pode ser uma alternativa promissora na tentativa de combater tal problema, sendo que muitos extratos de plantas têm demonstrado efeito anti-biofilme *in vitro*, como a inibição de seu desenvolvimento ou de seu sistema de comunicação^{14,15}.

Neste trabalho, objetivou-se avaliar a ação antimicrobiana, pela determinação da concentração inibitória mínima (CIM), e a capacidade de evitar a formação e erradicar biofilmes, de compostos obtidos de fungos endofíticos isolados de *Handroanthus ochraceus* (ipê-amarelo) contra a bactéria *S. aureus* ATCC 25923.

MATERIAIS E MÉTODOS

Isolamento de fungos endofíticos

Para o isolamento dos fungos endofíticos, foi utilizada a metodologia de Araújo et al. (2010)¹⁶. Foram coletadas flores de uma planta da espécie *Handroanthus ochraceus* (ipê-amarelo). No laboratório, elas foram enxaguadas inicialmente com água destilada autoclavada. Em seguida, foi realizada a desinfecção superficial pela imersão das flores por um minuto em solução de álcool a 70%, sob agitação vigorosa e constante. Após um minuto, a parte líquida foi descartada, restando apenas as flores no recipiente. O mesmo processo foi repetido utilizando-se solução de hipoclorito de sódio 3% durante três minutos e, após isso, solução de álcool a 70% por mais 30 segundos. Posteriormente, as flores foram enxaguadas duas vezes com água destilada autoclavada. Uma pequena alíquota de 100 µL da água do último enxágue foi inoculada em placa de Petri contendo meio ágar batata dextrose (BDA) e incubada, como forma de controle negativo.

Concluída a desinfecção, as flores de *H. ochraceus* foram cortadas em fragmentos de aproximadamente cinco milímetros. Foram alocados cinco fragmentos

equidistantes em cada placa de Petri, contendo meio BDA acrescido de 1 g.L^{-1} de terramicina para evitar o crescimento de bactérias endofíticas. As placas foram incubadas por sete dias a uma temperatura de $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$.

Após o crescimento dos fungos, estes foram purificados em meio BDA e, em seguida, caracterizados e enumerados. Eles foram nomeados com a inicial F, seguida de algarismos arábicos, cada algarismo representando um fungo com características macroscópicas diferentes. A preservação dos fungos endofíticos isolados foi realizada pelo método de Castellani (1967)¹⁷.

Obtenção de metabólitos secundários

Para a obtenção de metabólitos secundários foi utilizada a metodologia de Li et al. (2005) com modificações¹⁸. Os fungos foram incubados em meio BD (Batata Dextrose), em erlenmeyers, e incubados a $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ por nove dias em agitador orbital com 160 rpm. O meio fermentado (fase aquosa) foi coletado, centrifugado a 3.600 rpm por 10 minutos e filtrado em papel filtro. Essa fase aquosa foi separada em três partes, a fim de se obter polaridades diferentes: uma parte foi testada pura, outra solubilizada em acetato de etila e outra com clorofórmio. A escolha dos solventes foi baseada no grau de polaridade, do mais ao menos polar, respectivamente.

Para se solubilizar o meio fermentado com acetato de etila P.A., ele foi inserido em um funil de separação com o mesmo volume de solvente. O funil foi agitado e as fases foram separadas. A extração foi repetida mais duas vezes. O acetato de etila resultante da extração foi então concentrado em evaporador rotativo a 50°C até se obter cerca de 1 mL de composto. O material resultante da evaporação foi estocado a 4°C . O processo foi realizado da mesma forma para solubilizar a respectiva parte do meio fermentado com clorofórmio.

Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

Cada uma das partes (aquosa, solubilizada em acetato de etila e em clorofórmio) dos meios fermentados obtidas dos fungos endofíticos foram testadas contra a bactéria *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. O teste para determinar qual a menor concentração do metabólito fúngico capaz de impedir o crescimento microbiano foi realizado em microplacas de 96 poços, utilizando a técnica de microdiluição em caldo. Foram preparadas suspensões da bactéria em meio Müller-

Hinton (MH) com 24 horas de incubação a $37\pm 1^{\circ}\text{C}$ e a concentração foi ajustada para $1,5.10^8$ células. mL^{-1} .

Os poços das microplacas foram preenchidos com 150 μL do meio MH e, em seguida, foram adicionados 150 μL de do metabólito extraído dos fungos endofíticos. Foram realizadas diluições seriadas para se obter as concentrações de 50%, 25%, 10% e 5% dos compostos a serem testados. Adicionalmente foram distribuídos 15 μL da suspensão bacteriana em cada poço das microplacas.

Os testes foram realizados em triplicata, tendo sido incluídos controles positivos e negativos. Como controles negativos, foram utilizados poços com o antibiótico Ciprofloxacina 50mg/mL padrões e poços contendo somente o meio de cultura, sem inoculação das suspensões microbianas. Como controles positivos, utilizou-se meio de cultura acrescido de inóculo bacteriano, além de outro contendo somente os solventes utilizados no processo de extração dos metabólitos, para descartar a possibilidade de o efeito obtido ser decorrente do solvente e não do metabólito.

As microplacas foram incubadas em estufa a $37\pm 1^{\circ}\text{C}$ por 24 horas. A inibição do crescimento microbiano foi evidenciada pela ausência de crescimento no meio, sendo comparados com os poços controle, observando-se suas respectivas turvações. Após a leitura das microplacas, foi adicionado o corante Cloreto de Trifenil Tetrazólio como reagente para confirmação dos resultados. Além disso, semeou-se 100 μL do conteúdo dos poços da CIM em placas de Petri contendo Ágar MH, que foram incubadas por 24 horas a 37°C , para caracterizar o efeito resultante como bactericida ou bacteriostático.

Avaliação da formação de biofilme pela bactéria

Para verificar a formação de biofilmes, foi utilizada a metodologia descrita por Mulla et al. (2016). A bactéria *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 teve a sua densidade padronizada a 0,5 da escala de McFarland ($1,5.10^8$ células. mL^{-1}) e foi incubada em meio MH por 24 horas a $37\pm 2^{\circ}\text{C}$. Microplacas de 96 poços foram preenchidas com 200 μL de suspensão bacteriana e, em seguida, tubos plásticos esterilizados foram inseridos nos poços e utilizados como cavilhas para a formação de biofilmes. As placas foram cobertas com papel alumínio e incubadas em estufa por 5 dias a $37\pm 2^{\circ}\text{C}$.

Após, os tubos foram transferidos para novas microplacas contendo 200 µL de corante safranina a 0,1% e mantidos por cerca de 30 minutos. Em seguida, os tubos plásticos foram enxaguados com jatos de água destilada, a fim de eliminar as células que não estavam bem aderidas. A formação de biofilme foi confirmada pela permanência de coloração intensa nos tubos e a macroestrutura dos biofilmes pôde ser observada por meio de Microscopia Óptica.

Capacidade de inibição da formação de biofilme

Para avaliar o potencial dos metabólitos obtidos em inibir a formação de biofilmes, foi utilizada a metodologia de Mulla et al. (2016), com modificações¹⁹. A bactéria *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 teve a sua densidade padronizada a 0,5 da escala de McFarland (10^8 UFC.mL⁻¹) e foi incubada em meio MH por 24 horas a $37\pm 2^\circ\text{C}$. O ensaio foi realizado utilizando-se placas de microdiluição de 96 poços. Tubos plásticos autoclavados foram usados como cavilhas para promover uma superfície para a formação de biofilme.

Em cada poço, foram adicionados 100µL do inóculo bacteriano e mais 100µL do metabólito fúngico, utilizando-se a mesma diluição da CIM e os tubos foram então inseridos nos poços. Além disso, controles positivos foram realizados em poços contendo apenas 200µL da suspensão bacteriana e a superfície para crescimento. As placas foram cobertas por papel alumínio e incubadas em estufa por cinco dias a $37\pm 2^\circ\text{C}$. A formação de biofilme foi confirmada pela coloração das cavilhas com 0,1% de safranina por 30 minutos.

O efeito dos compostos em inibir a formação dos biofilmes pôde ser observado comparando a coloração dos tubos que foram submersos em poços contendo o metabólito e a bactéria com aqueles em que havia apenas a bactéria.

Determinação da Capacidade de Erradicação de Biofilmes

Para a determinação da Capacidade de Erradicação de Biofilme, os biofilmes foram formados na superfície de tubos autoclavados, conforme metodologia descrita anteriormente, depois transferidos para uma nova placa de 96 poços contendo meio MH e incubados por mais 24 horas. Em seguida, os tubos foram retirados, enxaguados em tampão PBS (pH: $7,2\pm 0,2$) e colocados em banho ultrassônico por um minuto, para retirar células pouco aderidas.

Os tubos foram então colocados em uma nova placa de 96 poços, na qual foram inseridos os compostos extraídos dos fungos endofíticos, que foram testados nas mesmas diluições encontradas nas CIMs. Na sequência, essa placa foi submetida a banho ultrassônico por dois a três minutos, agora visando realizar a ruptura mecânica dos biofilmes. Essa placa foi incubada por 24 horas a $37\pm 2^\circ\text{C}$. A erradicação dos biofilmes foi avaliada verificando-se a turbidez nos poços da placa de recuperação e por meio de coloração com Cloreto de Trifenil Tetrazólio (MULLA et al., 2016)¹⁹.

Observação dos biofilmes por Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Foram observadas por MEV as arquiteturas de biofilmes de *S. aureus* formados na ausência e na presença dos metabólitos dos fungos endofíticos testados (testes que avaliaram a inibição da formação dos biofilmes). A metodologia utilizada foi a descrita por Asahi et al. (2015)²⁰. Inicialmente, foi realizado um preparo em solução de formaldeído, deixando os objetos a serem analisados imersos por 30 minutos. Em seguida, foi realizada uma sequência de desidratação com etanol 50%, 70%, 80%, 90% e 95%, deixando as amostras por 30 minutos em cada uma das concentrações. Estas foram mantidas em álcool etílico absoluto até serem levadas à Universidade Federal do Paraná- Campus Palotina, onde foram analisadas.

As amostras foram levadas ao secador de ponto crítico com CO_2 modelo Leica EM CPD300. Após essa etapa, as amostras foram pulverizadas com partículas de ouro, em aparelho DentonVacuum. Logo após, foram analisadas em microscópio eletrônico, modelo Tescan Vega 3, com aumento de 12.000 x.

Identificação dos fungos endofíticos

Para a identificação dos fungos endofíticos isolados de *H. ochraceus*, as colônias isoladas foram semeadas em meio BDA e incubadas a temperatura de $25\pm 2^\circ\text{C}$ e analisadas quanto ao aspecto das colônias (formato micélio, cor da colônia, tempo de crescimento, bordas, entre outros). Para identificação de estruturas microscópicas foi utilizada a técnica do microcultivo em placa, de acordo com Kern e Blevins (1999)²¹. As placas foram incubadas a $25\pm 2^\circ\text{C}$ por sete dias. Após este período, as estruturas fúngicas foram coradas com lactofenol azul de algodão e visualizadas em microscópio óptico (NIKON).

Os microrganismos submetidos às técnicas de análise macroscópica e citológica foram confrontados com as chaves de classificação de fungos, observando-se as estruturas dos conidióforos, coloração da colônia, características das hifas²².

RESULTADOS

Foram obtidos 56 fungos endofíticos, os quais foram classificados em um banco de dados com base em suas características morfológicas macroscópicas. Desses 56, 11 foram selecionados aleatoriamente e cada uma de suas três fases (aquosa, solubilizada em clorofórmio e em acetato de etila) e testadas contra a bactéria *S. aureus* ATCC 25923.

Dos 33 compostos testados (11 de cada um dos solventes), oito apresentaram efeito inibitório no crescimento de células planctônicas de *S. aureus*, sendo cinco deles solubilizados em clorofórmio e três em acetato de etila. Dessa forma, 45,45% e 27,27% de todos os compostos de clorofórmio e de acetato, respectivamente, apresentaram atividade contra a bactéria. Nenhum dos meios fermentados puros (solventes polares) apresentou atividade. A Tabela 1 apresenta as menores concentrações em que tais atividades foram encontradas e classifica seu efeito como bactericida ou bacteriostático.

Tabela 1: Concentrações Inibitórias Mínimas e classificação efeitos obtidos com os compostos extraídos de fungos endofíticos isolados de *Handroanthus ochraceus* contra a bactéria *Staphylococcus aureus* ATCC25923.

Composto	CIM	Efeito
F1 A*	25%	Bactericida
F4 C*	37,5%	Bactericida
F21 C	50%	Bacteriostático
F22 A	25%	Bacteriostático
F34 C	25%	Bactericida
F34 A	25%	Bacteriostático
F39 C	50%	Bactericida
F53 C	37,5%	Bactericida

*A: acetato de etila; C: clorofórmio.

A maioria dos compostos em acetato de etila (66,67%) resultaram em efeito bacteriostático. Em comparação, a maioria dos compostos de clorofórmio (80%) exerceram efeito bactericida sobre *S. aureus*.

Quando submetida à formação de biofilme, a bactéria *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 demonstrou ser boa formadora de biofilme, sendo que os tubos permaneceram corados intensamente pela safranina, mesmo após o enxágue com água destilada. Além disso, pela microscopia óptica puderam-se observar aglomerados de células em uma estrutura compartilhada, comprovando, assim, a formação de biofilme.

Os oito compostos extraídos dos fungos endofíticos que apresentaram resultados satisfatórios na CIM foram testados, nas mesmas concentrações obtidas nas CIMs, para avaliar seus potenciais em inibir a formação de biofilmes de *S. aureus* (Tabela 2).

Tabela 2: Potencial de inibição da formação e erradicação de biofilmes apresentados pelos compostos extraídos de fungos endofíticos isolados de *Handroanthus ochraceus* contra a bactéria *Staphylococcus aureus* ATCC25923.

Composto*	Inibição da formação de biofilme**	Erradicação de biofilmes***
F1 A 25%	++	+
F4 C 37,5%	+	-
F21 C 50%	++	+
F22 A 25%	-	-
F34 C 25%	++	-
F34 A 25%	-	+
F39 C 50%	+-	-
F53 C 37,5%	+	+

*F: fungo endofítico isolado; A: acetato de etila; C: clorofórmio; concentração com atividade na CIM. **++: inibição completa, + inibição significativa, +-: inibição parcial, - sem inibição*** +: erradicou o biofilme; -: não erradicou o biofilme.

Dos compostos testados, três (37,5%) inibiram completamente a formação de biofilmes, dois (25%) permitiram uma pequena formação de biofilmes (inibição significativa), um (12,5%) inibiu parcialmente e dois (25%) não impediram a formação de biofilmes. Considerando-se os que tiveram resultados promissores,

pode-se afirmar que 62,5% dos compostos testados exibiram resultado satisfatório em prejudicar a formação de biofilmes pela bactéria. Quando se avalia comparativamente os dois tipos de solventes, pode-se afirmar que 80% e 33,33% dos compostos de clorofórmio e acetato de etila, respectivamente, tiveram resultados satisfatórios para inibir a formação de biofilme de *S. aureus* ATCC 25923.

Os compostos dos oito endófitos que apresentaram resultados foram testados, nas mesmas concentrações obtidas nas CIMs, para averiguar possíveis atividades em erradicar os biofilmes de *S. aureus* depois de formados. A Tabela 2 demonstra os resultados obtidos. Metade dos compostos avaliados (04) demonstraram atividade de erradicação (disrupção) do biofilme em sua arquitetura madura.

A formação dos biofilmes foi observada por MEV, sendo comparadas as estruturas formadas tanto na ausência quanto na presença dos metabólitos. Observou-se que, na presença de metabólito, a arquitetura estava menos íntegra, com desestruturação da matriz de exopolissacarídeo que une as células, além de menor densidade de células agrupadas. A Figura 1 demonstra as arquiteturas dos biofilmes analisadas por MEV.

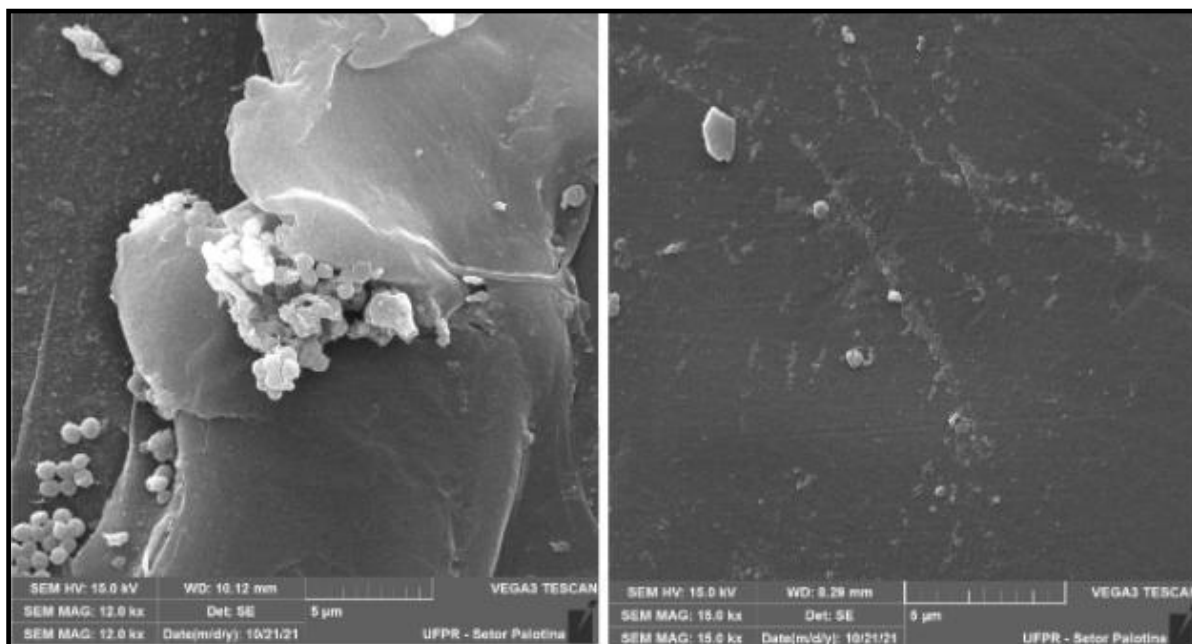


Figura 1: Arquiteturas dos biofilmes de *S. aureus* ATCC 25923 formadas na ausência (esquerda) e na presença (direita) do metabólito.

Dos fungos endofíticos testados, até o momento quatro foram identificados, sendo: F29- *Penicillium* sp., F34- *Aspergillus* sp., F36- *Phomopsis* sp. e F53- *Trichoderma* sp.

DISCUSSÃO

Microrganismos endofíticos habitam o interior de plantas pelo menos em uma parte de seu ciclo de vida, sem causar manifestação visível de doença²³. Dentre os microrganismos endofíticos, os fungos são de grande interesse para a comunidade científica, devido à produção de metabólitos secundários com aplicações na indústria farmacêutica. Esses endófitos têm sido, inclusive, sugeridos como responsáveis por grande parte da ação medicamentosa de plantas medicinais^{2, 24}.

Staphylococcus aureus é uma bactéria Gram-positiva que pode levar a diversas infecções em humanos e apresenta grande capacidade de desenvolver resistência aos antibióticos²⁵. Em consequência disso, têm sido desenvolvidos diversos estudos na busca de compostos alternativos que apresentem potencial antimicrobiano contra *S. aureus* ATCC 25923^{9,26}. No presente trabalho, foi avaliada a ação de compostos obtidos de endofíticos de *Handroanthus ochraceus* (ipê amarelo) contra as formas planctônicas e em biofilme dessa bactéria.

Foi possível se verificar que os compostos solubilizados em clorofórmio apresentaram melhor atividade antimicrobiana, o que é condizente com o estudo realizado por Arora e Kaur (2018)²⁷, no qual foi testado o potencial antimicrobiano de endofíticos obtidos de *Moringa oleifera*. No presente trabalho, os compostos obtidos em clorofórmio apresentaram maior atividade antimicrobiana, no geral, quando comparados aos obtidos em acetato de etila. Além disso, apresentaram maior efeito bactericida e resultados mais promissores em inibir a formação de biofilmes por *S. aureus*.

Estudos prévios já vêm demonstrando a ação de extratos clorofórmicos de plantas contra a bactéria *S. aureus*. No trabalho desenvolvido por Ashraf, Halim, Lim, Ramasamy e Sultan (2020), por exemplo, frações obtidas em clorofórmio de *Ficus deltoidea* apresentaram atividade contra *S. aureus*, enquanto as obtidas de *Orthosiphon stamineus* demonstraram atividade contra *Staphylococcus aureus* Resistente à Meticilina (MRSA)²⁸.

Os prováveis metabólitos secundários relacionados a essa ação em solvente de clorofórmio são terpenos e flavonoides²⁹. Os terpenos, ou terpenoides, correspondem à maior classe de produtos naturais e são muito utilizados para tratamento de doenças humanas. Esses compostos interagem molecularmente com vários componentes da fisiologia animal e humana, atuando como estimulantes do sistema imune, moduladores da coagulação sanguínea e interferindo em vias

inflamatórias³⁰. Possuem várias atividades biológicas conhecidas e servem como base para a produção de medicamentos com variadas atividades, tais como anticâncer (paclitaxel), antimalárica, anti-inflamatória e anti-infecciosa³¹.

Os flavonoides, por sua vez, também possuem significativa relevância médica, com funções anti-inflamatórias, antioxidantes, anticarcinogênicas, efeitos na redução de aterosclerose e neuroproteção, dentre outros³². Além disso, apresentam potencial atividade antibacteriana, seja por ação direta, por sinergismo com antibióticos ou por supressão da virulência bacteriana. Esse último potencial, por exemplo, inclui a inibição dos receptores de sinais de *quorum sensing*, com evidências de inibição de formação de biofilmes *in vitro*. Os flavonoides também têm demonstrado atividades contra *S. aureus* em vários estudos³³.

Os extratos em clorofórmio também têm sido estudados quanto ao seu efeito antibiofilme. Hayat, Sabri e McHugh (2018) avaliaram esses extratos obtidos do açafrão da terra (*Curcuma longa*) e os resultados demonstraram que os compostos alteraram a aderência, a motilidade celular, a produção de expolissacarídeos e a hidrofobicidade celular, todos componentes indispensáveis para a formação do biofilme³⁴. A presente pesquisa também pôde avaliar o comprometimento da formação de biofilmes em diferentes extratos clorofórmicos, dessa vez obtidos do ipê amarelo.

Os compostos obtidos de fungos endofíticos de *H. ochraceus* apresentaram maior ação em inibir a formação dos biofilmes do que em erradicar os biofilmes já formados. Esse resultado é concordante com o estudo realizado por Kaur, Arora, Kalia e Kaur (2020)³⁵, em que se avaliou o efeito antibiofilme de fungos *Aspergillus fumigatus* endofíticos de *Moringa oleifera*. Eles puderam observar que o potencial disruptivo do extrato clorofórmico contra os biofilmes pré-formados foi comparativamente menor do que na etapa de fixação inicial da célula.

Esse achado em comum pode ser explicado por algumas características dos biofilmes já formados e que conferem, a eles, resistência intrínseca a antimicrobianos. Os agentes antimicrobianos devem se difundir através da matriz de expolissacarídeo (EPS) para entrar em contato e inativar os organismos dentro do biofilme. Os EPS retardam a difusão reagindo quimicamente com as moléculas antimicrobianas ou limitando sua taxa de transporte. Além disso, os organismos associados ao biofilme têm taxas de crescimento reduzidas, minimizando a taxa de entrada de agentes antimicrobianos na célula e, portanto, afetando a cinética de

inativação. Por fim, o ambiente imediatamente ao redor das células dentro de um biofilme pode fornecer condições que protegem ainda mais o organismo¹².

Dentre os diversos gêneros de fungos identificados, o *Penicillium* sp. é um dos principais grupos de fungos, composto por mais de 200 espécies. Desde a descoberta da penicilina, esse gênero tem sido investigado por seu potencial antibiótico. Além dessa propriedade já bem estabelecida, outras atividades atribuídas ao gênero são: anticâncer, antitumoral, antioxidante, anti-inflamatória, antidiabética, entre outros³⁶. Dentre as diferentes classes de compostos atribuídas às diferentes ações de seus metabólitos, estão terpenoides, esteroides, policetídeos e alcaloides³⁷.

Espécies do gênero *Aspergillus* sp. também têm sido identificadas como endófitas de determinadas plantas, como *Hyoscyamus muticus*. Devido à produção de metabólitos como o ácido anofínico, esse gênero possui atividades antitumorais, antioxidantes, antimicrobianas, inclusive contra a bactéria *Staphylococcus aureus* e antibiofilmes. Sendo assim, esse gênero também se consagra como promissor no desenvolvimento de compostos obtidos alternativamente³⁸.

O gênero *Phomopsis* sp. também é uma fonte promissora de compostos bioativos no campo da descoberta farmacêutica, com grandes aplicabilidades médicas. Alguns dos metabólitos secundários produzidos por espécies desse gênero incluem xantonas, terpenos, fenóis, policetídeos e esteroides, com ações antifúngicas, antibacterianas, antivirais, antioxidantes, anti-inflamatórias, antimalárica, entre outras. Além disso, também têm sido descobertas ações desse gênero contra biofilmes, inibindo, por exemplo, o principal sistema de comunicação dessa estrutura, o *Quorum sensing*^{39,40}.

O gênero *Trichoderma* sp., por sua vez, abrange espécies de fungos filamentosos que exibem facilidade em colonizar diversos ambientes, principalmente devido à sua habilidade de secretar enzimas e substâncias com propriedades antibióticas. Além disso, espécies desse gênero produzem compostos com aplicações na medicina, agricultura e indústrias. Possuem estabelecida atividade antimicrobiana, inclusive contra a bactéria *Staphylococcus aureus*, com estudos prévios demonstrando também sua atividade contra biofilmes formados por essa espécie, por meio de desestruturação da matriz e redução da biomassa. Diversas classes de metabólitos parecem estar envolvidas nas diferentes aplicações do gênero *Trichoderma* sp., tais como terpenos, pironas, policetídeos, dentre outros^{41,42}.

CONCLUSÃO

O presente estudo avaliou o potencial de metabólitos obtidos de endófitos de *Handroanthus ochraceus* contra a bactéria *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. Os resultados demonstraram que os metabólitos apresentam potencial antimicrobiano tanto contra as formas livres da bactéria, bem como para inibir a formação de biofilme. Em um cenário de crescente resistência das bactérias aos antimicrobianos, as plantas têm sido potenciais fontes de compostos alternativos, e o presente trabalho reitera essa ideia. Estudos adicionais, como a utilização de técnicas moleculares para seguir explorando a diversidade dos endófitos presentes nessa planta serão necessários.

AGRADECIMENTOS

As autoras agradecem à Universidade Federal do Paraná- Campus Toledo e Campus Palotina pela disponibilidade dos equipamentos e suporte durante todo o desenvolvimento da pesquisa.

REFERÊNCIAS

1. CUNHA, P.; SILVA, A.P.; ROQUE, O.R.. **Plantas e produtos vegetais em fitoterapia**. Lisboa: Calouste Gulbenkian.
2. NICOLETTI, R.; FIORENTINO, A. Plant bioactive metabolites and drugs produced by endophytic fungi of Spermatophyta. **Agriculture**, Canada, 2015; 5:918-970.
3. CHALLIS, G.L.; HOPWOOD, D.A. Synergy and contingency as driving forces for the evolution of multiple secondary metabolite production by *Streptomyces* espécies. **Proc.Natl. Acad. Sci. USA**, 2003; 100:14555-14561.
4. GUNATILAKA, A. A. L. Natural products from plant-associated microorganisms: distribution, structural diversity, bioactivity, and implications of their occurrence. **Journal of Natural Products**, India, 2006; 69: 509-526.
5. KAUL, S.; GUPTA, S.; AHMED, M.; DHAR, M. K. Endophytic fungi from medicinal plants: a treasure hunt for bioactive metabolites. **Phytochemistry Reviews**, 2012; 11: 487–505.
6. JIA, M.; CHEN, L.; XIN, H.; ZHENG, C.; RAHMAN, K.; HAN, T. et al., A Friendly Relationship between Endophytic Fungi and Medicinal Plants: A Systematic Review. **Frontiers in Microbiology**, 2016; 7:1-14.

7. ALY, A. H.; DEBBAD, A.; J.; PROKSCH, P. Fungal endophytes: unique plant inhabitants with great promises. **Appl. Microbiol. Biotechnol**, 2011; 90: 1829-45.
8. SILVA, E.O. **Otimização das condições de cultivo e investigação das atividades citotóxicas e antimicrobiana de metabólitos secundários do fungo endofítico *Drechslera ravenelii***. Ribeirão Preto: Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo; 2010.
9. HOLETZ, F.B.; PESSINI, G.L.; SANCHES, N.R.; CORTEZ, D.A.G.; NAKAMURA, C.V.; FILHO, B.P.D. Screening of Some Plants Used in the Brazilian Folk Medicine for the Treatment of Infectious Diseases. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, 2002; 97: 1027-1031.
10. CHANG, J.; LEE, R.; LEE, W. A pursuit of *Staphylococcus aureus* continues: a role of persister cells. **Arch. Pharm. Res.** 2020.
11. McConoughey, S.J., Howlin, R., Granger, J.F., Manring, M.M., Calhoun, J.H., Shirtliff, M., et al. Biofilms in periprosthetic orthopedic infections **Fut Microbiol**, 2014;9: 987–1007.
12. DONLAN, R. M. Biofilm Formation: A Clinically Relevant Microbiological Process. **Clinical Infectious Diseases**, 2001; 33: 1387–1392.
13. GEBREYOHANNES, G.; NYERERE, A.; BII, C.; SBHATU, D.B. Challenges of intervention, treatment, and antibiotic resistance of biofilm-forming microorganisms. **Heliyon**, 2019; 5: 1-7.
14. Cesar de la Fuente-Nunez, Fany Reffuveille, Lucia Fernandez, Robert E.W. Hancock, Bacterial biofilm development as a multicellular adaptation: anti-biotic resistance and new therapeutic strategies, **Curr. Opin. Microbiol**, 2013; 16: 580–589.
15. HONGSHENG. Y.; LEI, Z.; LIN, L.; CHENGJIAN, Z.; LEIG.; WENCHAO, L.; PEIXIN, S. LUPING, Q. Recent developments and future prospects of antimicrobial metabolites produced by endophytes. **Microbiological Research**, 2010; 165: 437-449.
16. ARAÚJO, W. L.; LACAVA, P.T.; MARCO, J.; LIMA, A.O.S.; SOBRAL, J.K.; AZEVEDO, J.L. et al. (Coord.). **Guia prático: isolamento e caracterização de microrganismos endofíticos**. Piracicaba: CALQ, 2010.
17. CASTELLANI, A. Maintenance and cultivation of the common pathogenic fungi of man in sterile distilled water. Further researches. **J. trop Med. Hyg.**, 1967; 70: 181- 184.
18. LI, H. et al. Screening for endophytic fungi with antitumour and antifungal activities from Chinese medicinal plants. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, 2005; 21: 1515-1519.

19. MULLA,.; SKUMAR, A.;RAJDEV,S. Comparison of MIC with MBEC assay for in vitro antimicrobial susceptibility testing in biofilm forming clinical bacterial isolates. **Avances in Microbiology**, 2016; 06: 73-78.
20. ASAHI, Y. et al. Observação simples do biofilme de *Streptococcus mutans* por microscopia eletrônica de varredura usando líquidos iônicos. **AMB Express**, [S.l.], 2015; 10: 1-9.
21. KERN, M.E.; BLEVINS, K.S. **Micologia Médica**. 2ª ed. São Paulo: Editora Premier, 1999.
22. ELLIS, M.B. **More dematiaceous hyphomycetes**. Surrey, Common health Mycological Institut, 1971.
23. SELIM, K.A.; EL-BEIH A.A.; ABDEL-RAHMAN, T.M.; EL-DIWANY, A. Biology of Endophytic Fungi. **Current Rsearch in Environmental & Applied Mycology**, 2012; 2: 31-82.
24. STROBEL, G.; DAISY, B. Bioprospecting for microbial endopytes and their natural products. **Microbiology and Molecular Biology Review**, 2003; 67: 491-502.
25. MALANOVIC, N.; LOHNER, K.; Antimicrobial Peptides Targeting Gram-Positive Bacteria. **Pharmaceuticals**, 2016; 9.
26. BORGES, F.G.; ZUGMAN, T.; BANDEIRA, P.T.; DALMOLIN, M.C.; SCARIOT, D.B.; GARCIA, F.P. et al., Complementary Perfomance of Organoselenides and Organotellurides as Antimicrobials Agents. **J. Braz. Chem. Soc.**, 2021; 32: 462-475.
27. ARORA, D.S.; KAUR, N. Antimicrobial Potential of Fungal Endophytes from *Moringa oleifera*. **Appl Biochem Biotechnol**, 2018.
28. ASHRAF, K.; HALIM, H.; LIM, S.M.; RAMASAMY, K.; SULTAN, S. *In vitro* antioxidant, antimicrobial and antiproliferative studies of four different extracts of *Orthosiphon stamineus*, *Gynura procumbens* and *Ficus deltoidea*. **Saudi Journal of Biological Sciences**, 2020; 27: 417-432.
29. PANDEY, A.; TRIPATHI, S. Conceptof stadardization, extraction and pre phytochemical screening strategies for herbal drug. **Journal of pharmacy phytochemitry**, 2014; 2: 115-9.
30. TETALI, S.D. Terpenes and isoprenoids: a wealth of compounds for global use. **Planta**, 2019; 249: 1-8.
31. WANG, G.; TANG, W.; BIDIGARE, R. Terpenoids As Therapeutic Drugs and Pharmaceutical Agents. **Biology**, 2005.
32. MAGENEY, V.; NEUGART, S.; ALBACH, D.C. A Guide to the Variability of Flavonoids in *Brassica oleracea*. **Molecules**, 2017; 22.

33. CUSHNIE, T.P.T.; LAMB, A.J. Recent advances in understanding the antibacterial properties of flavonoids. **Int J Antimicrob Agents**, 2011; 38: 99-107.
34. HAYAT, S.; SABRI, A.N.; MCHUGH, T.D. Chloroform extract of tumeric inhibits biofilm formation, EPS production and motility in antibiotic resistant bacteria. **J. Gen. Appl. Microbiol.**, 2018; 63: 325-338.
35. KAUR, N.; ARORA, D.S.; KALIA, N., KAUR, M. Antibiofilm, antiproliferative, antioxidant and antimutagenic activities of an endophytic fungus *Aspergillus fumigatus* from *Moringa oleifera*, 2020; 47: 2901-2911.
36. TOGHUEO, R.M.K.; BOYOM, F.F. Endophytic *Penicillium* species and their agricultural, biotechnological, and pharmaceutical applications. **Biotech**, 2020; 10.
37. MADY, M.S.; HAGGAG, E.G. Review on Fungi of Genus *Penicillium* as producers of Biologically Active Polyketides. **JAPR**, 2020; 4: 33-45.
38. Elkhoully, H.I.; HAMED, A. A.; HOSAINY, A.M.; GHAREEB, M.A.; SIDKEY, N.M. Bioactive Secondary Metabolite from Endophytic *Aspergillus Tubenginses* ASH4 Isolated from *Hyoscyamus muticus*: Antimicrobial, Antibiofilm, Antioxidant and Anticancer Activity. **Pharmacogn J.**, 2021; 13: 434-442.
39. XU, T.; LU, Y.; WANG, J.; SONG, Z.; HOU, Y.; LIU, S. et al. Bioactive Secondary Metabolites of the Genus *Diaporthe* and Anamorph *Phomopsis* from Terrestrial and Marine Habitats and Endophytes: 2010-2019. **Microorganisms**, 2021; 9.
40. MEENA, H.; MISHRA, R.; RANGANATHAN, S.; SARMA, V.V.; AMPASALA, D.R.; KALIA, V.C. et al. *Phomopsis tersa* as Inhibitor of Quorum Sensing System and Biofilm Forming Ability of *Pseudomonas aeruginosa*. **Indian J Microbiol.**, 2020; 60: 70-77.
41. SANTOS, S.S.; AUGUSTO, D.G.; ALVES, P.A.C.; PEREIRA, J.S.; DUARTE, L.M.B, MELO, P.C et al. *Trichoderma asperelloides* ethanolic extracts efficiently inhibit *Staphylococcus* growth and biofilm formation. **PLoS ONE.**, 2018; 13: 1-12.
42. LEYLAIE, S.; ZAFARI, D. Antiproliferative and Antimicrobial Activities of Secondary Metabolites and Phylogenetic *Trichoderma* Species from *Vinca* Plants. **Front. Microbiol.**, 2018; 9: 1-12.

3 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os principais objetivos do trabalho conseguiram ser atendidos durante o desenvolvimento dessa pesquisa, bem como as hipóteses foram elucidadas. No projeto de pesquisa elaborado, tinha-se como um dos objetivos específicos do trabalho a avaliação das estruturas dos biofilmes por microscopia de fluorescência. No entanto, o aparelho do Campus UFPR- Palotina estava com problemas técnicos e impossibilitou o desenvolvimento.

Além disso, apesar de não estar previsto originalmente no projeto de pesquisa enviado, julgamos que seria de grande valia acrescentar o processo de identificação macroscópica dos fungos, bem como a identificação dos metabólitos secundários. Alguns fungos já foram identificados, como consta no artigo, e outros estão sendo mais difíceis de identificar, mas serão identificados ainda no início de 2022. Por fim, devido à pandemia, houve um atraso na prática e por isso os compostos (metabólitos secundários) também passarão por identificação no início de 2022. O artigo provavelmente será submetido com essas informações.

O trabalho desenvolvido servirá, futuramente, como base para novas pesquisas visando impedir a formação de biofilmes nas superfícies de Cateteres Venosos Centrais. Os resultados encontrados parecem ser promissores.

4 REFERÊNCIAS

AZEVEDO, J.L.; MacCHERONI, Jr. W.; PEREIRA, J. O.; ARAÚJO, W.L. Endophytic microorganisms: a review on insect control and recent advances on tropical plants. **Eletronic Journal of Biotechnology**, v. 3, n.1, p.40-65, 2000.

CHALLIS, G.L.; HOPWOOD, D.A. Synergy and contingency as driving forces for the evolution of multiple secondary metabolite production by *Streptomyces* espécies. **Proc.Natl. Acad. Sci. USA**, v . 100, p. 14555-14561, 25 nov 2003.

COSTERTON, J. W.; STEWART, P.S.; GREENBERG, E.P. Bacterial Biofilms: A Common Cause of Persistent Infections. **Science**, [s. l.], v. 284, ed. 5418, p. 1318-1322, 21 maio 1999.

DAROUICHE, R. O. Treatment of infections associated with surgical implants. **The New England Journal of Medicine** , [S. l.], v. 350, n. 14, p. 1422-1429, 1 abr. 2004.

DEMAIN, A.L.; SANCHEZ S. Microbial drug discovery: 80 years of progress. **J Antibiot**, v. 62, p. 5-16, 2009.

DONLAN, R. M. Biofilm Formation: A Clinically Relevant Microbiological Process. **Clinical Infectious Diseases**, [s. l.], v. 33, ed. 8, p. 1387–1392, 15 out. 2001.

ENGELKIRK, P.G.; ENGELKIRK, J.D.; Burton **Microbiologia para as ciências da saúde**. 9th ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2012. 436 p.

GEBREYOHANNES, G. et al. Challenges of intervention, treatment, and antibiotic resistance of biofilm-forming microorganisms. **Heliyon**, [s. l.], v. 5, ed. 8, p. 1-7, 19 ago. 2019.

GOMINET, M. et al. Central venous catheters and biofilms: Where do we stand in 2017?. **Journal of pathology, microbiology and immunology**, [s. l.], v. 125, ed. 4, p. 365-375, 13 abr. 2017.

GUPTA, A.; MUMTAZ, S.; LI, C.; HUSSAIN, I.; ROTELLO, V.M. Combatting antibiotic-resistant bacteria using nanomaterials. **Chem Soc Rev**, v. 48, p. 415- 427, 2019.

HONGSHENG. Y.; LEI, Z.; LIN, L.; CHENGJIAN, Z.; LEIG.; WENCHAO, L.; PEIXIN, S. LUPING, Q. Recent developments and future prospects of antimicrobial metabolites produced by endophytes. **Microbiological Research**, v. 165, n.6, p. 437-449, 2010.

JAMAL, M. et al. Bacterial biofilm and associated infections. **Journal of the Chinese Medical Association**, [s. l.], v. 81, ed. 1, p. 7-11, Jan 2018.

PEIXOTO NETO, P.A.S.; AZEVEDO, J.L.; ARAÚJO, W.L. Microorganismos endofíticos: interação com plantas e potencial biotecnológico. **Revista Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, n.29, p.62-76, 2002.

STROBEL, G.; DAISY, B. Bioprospecting for microbial endophytes and their natural products. **Microbiology and Molecular Biology Review**. v.67, n.4, p.491-502, 2003.

SUDHA, V.; GOVINDARAJ, R.; BASKAR, K.; AL-DHABI, N.A.; DURAI PANDIYAN, V. Biological properties of Endophytic Fungi. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v; 59, p. 01-07, 2016.

ZHANG, H.W.; SONG, Y.C.; TAN, R.X. Biology and chemistry of endophytes. **Natural Products Reports**, v. 25, n. 5, p. 753-771, 2006.

ZHANG, L.; LIANG, E.; CHENG, Y.; MAHMOOD, T.; GE, F.; ZHOU, K.; BAO, M.; LV, L.; LI, L.; YI, J.; LU, C.; TAN, Y. Is combined medication with natural medicine a promising therapy for bacterial biofilm infection? **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 128, 2020.

ANEXO 1 – NORMAS DA REVISTA

Para acesso completo às normas da revista, acesse o site:
https://www.elsevier.com/wps/find/journaldescription.cws_home/623083?generatepdf=true

GUIDE FOR AUTHORS .

Major articles. Articles in this category usually present results of original research undertaken by the author. Typically these articles average 12-15 double-spaced typewritten pages with up to 5 tables and/or figures, and 15-25 references. Authors must include a structured abstract of 150 to 200 words. Structured abstracts should include Background, Methods, Results (including some data), Discussion, and Conclusions. Articles which focus on comparative effectiveness research and implementation or translational science are particularly welcome.

PREPARATION

The following guidelines for submission of manuscripts will expedite the review process and ensure that publication is not delayed.

New Submissions

Submission to this journal proceeds totally online and you will be guided stepwise through the creation and uploading of your files. The system automatically converts your files to a single PDF file, which is used in the peer-review process.

This must be submitted as a Word document, in any format or lay-out that can be used by referees to evaluate your manuscript. It should contain high enough quality figures for refereeing. If you prefer to do so, you may still provide all or some of the source files at the initial submission. Please note that individual figure files larger than 10 MB must be uploaded separately.

References

There are no strict requirements on reference formatting at submission. References can be in any style or format as long as the style is consistent. Where applicable, author(s) name(s), journal title/ book title, chapter title/article title, year of publication, volume number/book chapter and the article number or pagination must be present. Use of DOI is highly encouraged. The reference style used by the journal

will be applied to the accepted article by Elsevier at the proof stage. Note that missing data will be highlighted at proof stage for the author to correct.

Figures and tables embedded in text

Please ensure the figures and the tables included in the single file are placed next to the relevant text in the manuscript, rather than at the bottom or the top of the file. The corresponding caption should be placed directly below the figure or table.

REVISED SUBMISSIONS

Article structure

Manuscripts must conform to acceptable English usage. For current usage, consult the AMA Manual of Style, A Guide for Authors and Editors, Tenth Edition, ISBN 0-978-0-19-517633-9 (see [http:// www.amamanualofstyle.com](http://www.amamanualofstyle.com)). Generic drug and product names should be used; however, proprietary names may be inserted in parentheses after the generic name in the Methods section only. If equipment must be identified by proprietary name, provide the manufacturer name and city/state in the Methods section while referring to it generically elsewhere in the paper. Weights and measures should be expressed in metric units. Temperatures should be expressed in degrees centigrade. Manuscript pages. The abstract should follow the title page. Authors should double-space all text, maintain one-inch page margins and use a basic font such as New Times Roman. The references should be included in the same file as the manuscript.

Double-blind Review

This journal uses double-blind review, which means that both the reviewer and author name(s) are not revealed to one another for a manuscript under review. The identities of the authors are concealed from the reviewers, and vice versa. For more information please refer to <https://www.elsevier.com/reviewers/peer-review>. To facilitate this, please include the following separately:

Title page (with author details): This should include the title, authors' names and affiliations, and a complete address for the corresponding author including telephone and e-mail address.

Abstract (when applicable): This should be a formatted version of the paper's abstract, submitted separately.

Blinded manuscript (no author details): The main body of the paper (including acknowledgments, references, tables, and figures) should not include any identifying information, such as the authors' names or affiliations.

Background

State the objectives of the work and provide an adequate background, avoiding a detailed literature survey or a summary of the results.

Material and methods

Provide sufficient details to allow the work to be reproduced by an independent researcher. Methods that are already published should be summarized, and indicated by a reference. If quoting directly from a previously published method, use quotation marks and also cite the source. Any modifications to existing methods should also be described.

Results

Results should be clear and concise.

Discussion

This should explore the significance of the results of the work, not repeat them. A combined Results and Discussion section may sometimes be appropriate. Avoid extensive citations and discussion of published literature.

Conclusions

The main conclusions of the study may be presented in a short Conclusions section, which may stand alone or form a subsection of a Discussion section.

Appendices

If there is more than one appendix, they should be identified as A, B, etc. Formulae and equations in appendices should be given separate numbering: Eq. (A.1), Eq. (A.2), etc.; in a subsequent appendix, Eq. (B.1) and so on. Similarly for tables and figures: Table A.1; Fig A.1, etc. Generally, however, appendices are not recommended but may be made available by request from the authors for reviewers, or for readers if the manuscript is accepted for publication.

Essential Title Page Information

- Title. Concise and informative; brief and not laden with too much detail. Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations and formulae where possible.

- Title page. The first title page should include the title; name(s) and academic degree(s) of the author(s); name(s) of the department(s) and institution(s) in which

the work was done; and name, address, business and home telephone numbers, and e-mail address of the author to whom correspondence and reprint requests should be addressed.

- Author names and affiliations. Where the family name may be ambiguous (e.g., a double name), please indicate this clearly. Present the authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a lower-case superscript letter immediately after the author's name and in front of the appropriate address. Provide the full postal address of each affiliation, including the country name and, if available, the e-mail address of each author.

- Corresponding author. Clearly indicate who will handle correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication. Ensure that phone numbers (with country and area code) are provided in addition to the e-mail address and the complete postal address. Contact details must be kept up to date by the corresponding author.

- Present/permanent address. If an author has moved since the work described in the article was done, or was visiting at the time, a 'Present address' (or 'Permanent address') may be indicated as a footnote to that author's name. The address at which the author actually did the work must be retained as the main affiliation address.

Save this title page as a separate file for your submission via EM. A second title page without any author information should begin the full manuscript file. This page will be used for double-blind peer review.

Highlights

Highlights are mandatory for this journal as they help increase the discoverability of your article via search engines. They consist of a short collection of bullet points that capture the novel results of your research as well as new methods that were used during the study (if any). Please have a look at the examples here: example Highlights.

Highlights should be submitted in a separate editable file in the online submission system. Please use 'Highlights' in the file name and include 3 to 5 bullet points (maximum 85 characters, including spaces, per bullet point).

Structured abstract

A structured abstract, by means of appropriate headings, should provide the context or background for the research and should state its purpose, basic

procedures (selection of study subjects or laboratory animals, observational and analytical methods), main findings (giving specific effect sizes and their statistical significance, if possible), and principal conclusions. It should emphasize new and important aspects of the study or observations.

Unstructured abstracts

Unstructured abstracts are used for Brief Reports.

Graphical abstract

Although a graphical abstract is optional, its use is encouraged as it draws more attention to the online article. The graphical abstract should summarize the contents of the article in a concise, pictorial form designed to capture the attention of a wide readership. Graphical abstracts should be submitted as a separate file in the online submission system. Image size: Please provide an image with a minimum of 531 × 1328 pixels (h × w) or proportionally more. The image should be readable at a size of 5 × 13 cm using a regular screen resolution of 96 dpi. Preferred file types: TIFF, EPS, PDF or MS Office files. You can view Example Graphical Abstracts on our information site. Authors can make use of Elsevier's Illustration Services to ensure the best presentation of their images and in accordance with all technical requirements.

Keywords

Immediately after the abstract, provide a maximum of 6 keywords, using American spelling and avoiding general and plural terms and multiple concepts (avoid, for example, 'and', 'of'). Be sparing with abbreviations: only abbreviations firmly established in the field may be eligible. These keywords will be used for indexing purposes.

Abbreviations

Standard abbreviations should be used consistently throughout the article. Unusual or coined abbreviations should be spelled out the first time they appear in text, with abbreviation in parentheses. Ensure consistency of abbreviations throughout the article.

Acknowledgments

Collate acknowledgements in a separate section at the end of the article before the references and do not, therefore, include them on the title page, as a footnote to the title or otherwise. List those individuals who provided help during the research (e.g.,

providing language help, writing assistance or proof reading the article, collecting data, etc).

Math formulae

Please submit math equations as editable text and not as images. Present simple formulae in line with normal text where possible and use the solidus (/) instead of a horizontal line for small fractional terms, e.g., X/Y . In principle, variables are to be presented in italics. Powers of e are often more conveniently denoted by exp. Number consecutively any equations that have to be displayed separately from the text (if referred to explicitly in the text).

Table footnotes

Indicate each footnote in a table by using the symbols hierarchy (i.e., *, †, ‡, §, etc).

Footnotes

Footnotes should be used sparingly. Number them consecutively throughout the article. Many Word processors build footnotes into the text, and this feature may be used. Should this not be the case, indicate the position of footnotes in the text and present the footnotes themselves separately at the end of the article.

Artwork

Electronic artwork

General points

- Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork.
- Preferred fonts: Arial (or Helvetica), Times New Roman (or Times), Symbol, Courier.
- Number the illustrations according to their sequence in the text.
- Use a logical naming convention for your artwork files.
- Indicate per figure if it is a single, 1.5 or 2-column fitting image.
- For Word submissions only, you may still provide figures and their captions, and tables within a single file at the revision stage.
- Please note that individual figure files larger than 10 MB must be provided in separate source files.

A detailed guide on electronic artwork is available.

You are urged to visit this site; some excerpts from the detailed information are given here.

Formats

Regardless of the application used, when your electronic artwork is finalized, please

'save as' or convert the images to one of the following formats (note the resolution requirements for line drawings, halftones, and line/halftone combinations given below):

EPS (or PDF): Vector drawings. Embed the font or save the text as 'graphics'.

TIFF (or JPG): Color or grayscale photographs (halftones): always use a minimum of 300 dpi.

TIFF (or JPG): Bitmapped line drawings: use a minimum of 1000 dpi.

TIFF (or JPG): Combinations bitmapped line/half-tone (color or grayscale): a minimum of 500 dpi is required.

Please do not:

- Supply files that are optimized for screen use (e.g., GIF, BMP, PICT, WPG); the resolution is too low.
- Supply files that are too low in resolution.
- Submit graphics that are disproportionately large for the content.

Color Artwork

Please make sure that artwork files are in an acceptable format (TIFF (or JPEG), EPS (or PDF), or MS Office files) and with the correct resolution. If, together with your accepted article, you submit usable color figures then Elsevier will ensure, at no additional charge, that these figures will appear in color both on the Web (e.g., ScienceDirect and other sites) and in print at no additional fee to the author. For further information on the preparation of electronic artwork, please see <https://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

Illustration services

Elsevier's Author Services offers Illustration Services to authors preparing to submit a manuscript but concerned about the quality of the images accompanying their article. Elsevier's expert illustrators can produce scientific, technical and medical-style images, as well as a full range of charts, tables and graphs. Image 'polishing' is also available, where our illustrators take your image(s) and improve them to a professional standard. Please visit the website to find out more.

Figure captions

Ensure that each illustration has a caption. A caption should comprise a brief title (not on the figure itself) and a description of the illustration. Keep text in the illustrations themselves to a minimum but explain all symbols and abbreviations used.

Tables

Number tables consecutively in accordance with their appearance in the text. Place footnotes to tables below the table body and indicate them with superscript symbols (following symbol hierarchy of asterisk, dagger, double dagger, sectional symbol, etc.) Avoid vertical rules. Be sparing in the use of tables and ensure that the data presented in tables do not duplicate results described elsewhere in the article.

References

Place the reference list in the file after the main text. Number references consecutively in order of their mention in the text; all references must be cited in the text. Personal communications and unpublished data should be cited in the text in parentheses; they should not appear in the reference list.

Citation in text

Please ensure that every reference cited in the text is also present in the reference list (and vice versa). Any references cited in the abstract must be given in full. Unpublished results and personal communications are not recommended in the reference list, but may be mentioned in the text. If these references are included in the reference list they should follow the standard reference style of the journal and should include a substitution of the publication date with either 'Unpublished results' or 'Personal communication'. Citation of a reference as 'in press' implies that the item has been accepted for publication.

Reference links

Increased discoverability of research and high quality peer review are ensured by online links to the sources cited. In order to allow us to create links to abstracting and indexing services, such as Scopus, CrossRef and PubMed, please ensure that data provided in the references are correct. Please note that incorrect surnames, journal/book titles, publication year and pagination may prevent link creation. When copying references, please be careful as they may already contain errors. Use of the Digital Object Identifier (DOI) is encouraged.

Web references

As a minimum, the full URL should be given and the date when the reference was last accessed. Any further information, if known (DOI, author names, dates, reference to a source publication, etc.), should also be given. Web references can be listed separately (e.g., after the reference list) under a different heading if desired, or can be included in the reference list.

Data references

This journal encourages you to cite underlying or relevant datasets in your manuscript by citing them in your text and including a data reference in your Reference List. Data references should include the following elements: author name(s), dataset title, data repository, version (where available), year, and global persistent identifier. Add [dataset] immediately before the reference so we can properly identify it as a data reference. The [dataset] identifier will not appear in your published article.

Reference management software

Most Elsevier journals have their reference template available in many of the most popular reference management software products. These include all products that support Citation Style Language styles, such as Mendeley. Using citation plug-ins from these products, authors only need to select the appropriate journal template when preparing their article, after which citations and bibliographies will be automatically formatted in the journal's style. If no template is yet available for this journal, please follow the format of the sample references and citations as shown in this Guide. If you use reference management software, please ensure that you remove all field codes before submitting the electronic manuscript. More information on how to remove field codes from different reference management software.

Reference formatting

There are no strict requirements on reference formatting at submission. References can be in any style or format as long as the style is consistent. Where applicable, author(s) name(s), journal title/ book title, chapter title/article title, year of publication, volume number/book chapter and the article number or pagination must be present. Use of DOI is highly encouraged. The reference style used by the journal will be applied to the accepted article by Elsevier at the proof stage. Note that missing data will be highlighted at proof stage for the author to correct. If you do wish to format the references yourself they should be arranged according to the following examples:

Reference style

Follow the format of the "Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals" (Ann Intern Med 1997;126:36-47). Use journal abbreviations as listed in the Cumulated Index Medicus.

Text: Indicate references by (consecutive) superscript Arabic numerals in the order in which they appear in the text. The numerals are to be used outside periods and

commas, inside colons and semicolons.

List: Number the references in the list in the order in which they appear in the text.

Examples of References (if 6 or fewer authors, list all; if 7 or more, list first 6 and et al):

Format for Journal Articles:

Steed C, Kelly JW, Blackhurst D, Boeker S, Diller T, Alper P, et al. Hospital hand hygiene opportunities: Where and when (HOW2)? The HOW2 Benchmark Study. *Am J Infect Control* 2011;39:19-26.

Format for Books:

World Health Organization. World Alliance for Patient Safety. WHO Guidelines on Hand Hygiene in Health Care 2009. Geneva [Switzerland]: WHO Press; 2009.

Format for Chapters:

Weinstein L, Swartz MN. Pathogenic properties of invading microorganisms. In: Sodeman WA Jr, Sodeman WA, editors. *Pathologic physiology: mechanisms of disease*. Philadelphia: WB Saunders; 1974. p. 457-72.

Dataset

Oguro M, Imahiro S, Saito S, Nakashizuka T. Mortality data for Japanese oak wilt disease and surrounding forest compositions, Mendeley Data, v1; 2015. <http://dx.doi.org/10.17632/xwj98nb39r.1>.

Journal abbreviations source

Journal names should be abbreviated according to the list of title word abbreviations: <http://www.issn.org/2-22661-LTWA-online.php>.

Visual Abstracts

The American Journal of Infection Control has adopted visual abstracts as a dissemination method to spread the scientific research published in our journal. A visual abstract is a visual summary of the information usually found within the abstract portion of an article. Similar to the actual text abstract of a research article, it is meant to convey key findings in a shorter format.

To help you in your efforts, our Infographics editors will send you materials to help you get started: An AJIC PowerPoint template for you to enter your text and icons. Examples of previous AJIC visual abstracts for inspiration. The Visual Abstract Primer by Andrew M. Ibrahim (the creator of visual abstracts) @AndrewMIbrahim.

Below are the steps you will work through:

Put together a draft of the visual abstract including key findings. You will select black

and White icons to represent your study background, methods, and results. You will then send the draft to the Inforgraphics editors, who will select similar icons from ImageBank. AJIC has a membership with this icon platform and will purchase all icons for your visual abstract. We will make suggestions and send the abstract back to you for further revisions. Once you are pleased with the version, we will prepare the visual abstract for dissemination via social media platforms. If you're not on twitter please sign-up and send us your hashtag so you can be part of the dissemination efforts. - <https://help.twitter.com/en/create-twitter-account>.

For further information, please contact Jeanne Brandt, Managing Editor at: jb3948@columbia.edu.