



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE  
CURSO DE GRADUAÇÃO EM BIOMEDICINA

Susana de Oliveira Elias

**ESTUDO DA ATIVIDADE ANTIBIOFILME DE BACTÉRIAS ANTÁRTICAS  
SOBRE MICRORGANISMOS DE IMPORTÂNCIA MÉDICA**

Porto Alegre

2011

Susana de Oliveira Elias

**ESTUDO DA ATIVIDADE ANTIBIOFILME DE BACTÉRIAS ANTÁRTICAS  
SOBRE MICRORGANISMOS DE IMPORTÂNCIA MÉDICA**

Trabalho de conclusão de curso de graduação  
apresentado ao Instituto de Ciências Básicas da  
Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do  
Sul, como requisito parcial para obtenção do  
título de Bacharel em Biomedicina.

Área de concentração: Biologia Molecular

Orientador: Prof. Dr. Alexandre José Macedo

Porto Alegre

2011

## **Agradecimentos**

A Deus, pelo dom da vida e por todas as bênçãos recebidas.

Aos meus pais, por todo amor, carinho e dedicação. Por sempre terem me apoiado, acreditando nos meus sonhos e me ajudando a realizá-los.

Ao Tiago Baptista Noronha, pela paciência, pela ajuda e por todos os momentos de alegria e descontração.

A minhas irmãs, em especial à Silvana, que nos deixou tão recentemente, mas sempre estará viva em nossos corações. Obrigada por todos os conselhos e exemplos de vida.

Aos meus sobrinhos, por todas as brincadeiras, risadas e questionamentos, tornando meu cotidiano mais descontraído e alegre.

A todos meus familiares, que mesmo em outros estados fizeram-se presentes com seus telefonemas, e-mails e visitas.

Aos meus amigos e colegas, por compartilharem comigo tantos momentos felizes e inesquecíveis.

Ao Prof. Alexandre José Macedo por todos ensinamentos, dedicação, confiança, incentivo, paciência e acima de tudo pela amizade e carinho.

Aos meus colegas do laboratório de Biofilmes e Diversidade Microbiana, em especial ao Igor, à Karine e à Dani Trentin pelos ensinamentos, paciência, carinho e dedicação. Ao Lucas por me ajudar a desvendar os mistérios do fermentador. À Raquel por me ensinar os primeiros passos dessa longa caminhada chamada purificação. À Janine, Élen, Clara e Sharon pelos momentos de descontração e alegria.

À UFRGS e ao Centro de Biotecnologia pela qualidade do ensino e infraestrutura adequada, proporcionando um ambiente acadêmico inspirador e de grande excelência.

Ao CNPq, pelo suporte financeiro, imprescindível para realização deste trabalho.

Aos membros da banca, por terem aceitado o convite.

*“Ninguém é tão sábio que nada tenha para aprender,  
nem tão tolo que nada tenha para ensinar.”*

Blaise Pascal

Dedico este trabalho aos meus pais,  
João Elias e Olga de Oliveira Elias,  
que são minha inspiração,  
minha força, meus heróis.

## Índice geral

Lista de abreviaturas .....	VI
Resumo.....	VII
Índice de figuras .....	VIII
1. Introdução .....	9
1.1 Biofilmes Microbianos .....	9
1.2 Estratégias antibiofilme .....	14
1.3 Biofilmes de <i>Staphylococcus epidermidis</i> .....	18
1.4 Biofilmes de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	19
1.5 Antártica .....	20
2. Objetivos .....	22
3. Trabalho experimental em formato de artigo científico.....	23
4. Conclusões e Perspectivas.....	59
5. Anexos .....	60
Normas para correção do Trabalho de Conclusão de Curso de Biomedicina. ....	60
Normas para apresentação oral e escrita do trabalho experimental do estágio em pesquisa e monografia .....	61
6. Bibliografia .....	63

**Lista de abreviaturas**

EPS - substância extracelular polimérica

QS - “quorum sensing”

AHL - acilhomoserinolactonas

AI-2 - autoindutor-2

CDC – Centro de Controle e Prevenção de Doenças dos Estados Unidos

QSI - inibidores do sistema QS

DNAe - DNA extracelular

FC - fibrose cística

## Resumo

Biofilmes são agregados de microrganismos aderidos a uma superfície e rodeados por matriz exopolissacarídica, sendo regulados pelo sistema de “quorum sensing”. Esse modo de vida proporciona maior proteção e resistência aos microrganismos. Assim, a busca por compostos antibiofilme é essencial para o combate de infecções associadas a biofilmes. O ambiente antártico apresenta várias condições adversas aos microrganismos, então para garantir sua sobrevivência, eles podem liberar compostos com atividade antimicrobiana e antibiofilme. Nesse contexto, esse trabalho busca compostos antibiofilme e antibacterianos em bactérias isoladas da ilha Rei George, Península Antártica. Para isso, realizou-se o cultivo desses microrganismos, para obtenção dos extratos brutos; ensaios de quantificação de crescimento bacteriano e de formação de biofilme utilizando *Staphylococcus epidermidis* e *Pseudomonas aeruginosa*, para análise da atividade; técnicas de purificação como, extração em fase sólida e cromatografia em camada delgada, para elucidação dos prováveis componentes e possíveis mecanismos de ação. Os resultados encontrados evidenciaram o grande potencial dos microrganismos do continente antártico, visto que 73,5% dos filtrados testados apresentaram alguma bioatividade. Em adição, a maioria dos isolados antárticos mostraram ação (antibiofilme ou antibacteriana) contra *S. epidermidis*. Entretanto, contra *P. aeruginosa* apenas 5,1% das bactérias da Antártica foram ativas, demonstrando uma maior dificuldade na busca por moléculas ativas contra essa bactéria. O isolado S22L2 (*Pseudomonas sp*) mostrou-se bastante promissor, graças a sua alta atividade antibiofilme e não interferência no crescimento bacteriano. Por isso, seu extrato foi parcialmente purificado, mostrando como possíveis componentes ativos as aminas, os aminoácidos e os polifenóis, compostos que vêm sendo descritos com atividade antibiofilme. Também, descartou-se a presença dos compostos terpenóides, fenilpropanóides, esteróides, saponinas, cumarinas e antraquinona. Entretanto, estudos químicos mais avançados de isolamento e purificação são necessários para identificar e caracterizar todos componentes funcionais do extrato S22L2.

**Palavras chave:** biofilmes microbianos, compostos antibiofilme, *Staphylococcus epidermidis*, *Pseudomonas sp*, Antártica, rastreamento de bioatividade.

**Índice de figuras**

Figura 1: Etapas da formação de biofilme.....	10
Figura 2: Principais moléculas autoindutoras do sistema QS.....	12
Figura 3: Sistema “quorum sensing” em bactérias Gram-positivas (caixas listradas) e em Gram-negativas (caixas pretas).....	13
Figura 4: Estado fisiológico do biofilme.....	13
Figura 5: Principais alvos de moléculas antibiofilme.....	15
Figura 6: Exemplos de pilicidas, drogas que inibem a formação de pili.....	16
Figura 7: Exemplos de inibidores do sistema “quorum sensing” .....	17

## 1. Introdução

### 1.1 Biofilmes Microbianos

Biofilme é um estilo de vida microbiano, adotado pela maioria das bactérias no ambiente e em infecções, no qual ocorre a adesão de populações de microrganismos a superfícies bióticas e abióticas, com produção de matriz exopolissacarídica que reveste as colônias aderidas. A formação de biofilme é uma característica bastante conservada entre os procariotos, tendo sido encontrados fósseis de biofilmes datados de cerca de 3,4 bilhões de anos atrás<sup>1</sup>.

A primeira observação de um biofilme feita pelo homem foi em 1675, quando Antonie van Leeuwenhoek descreveu a ocorrência do que ele chamou de “pequenos animais” em seu dente. Entretanto, a teoria geral de biofilmes foi publicada apenas em 1978<sup>2</sup>. Desde então o interesse por essa área de estudo vem aumentando e muito tem sido feito para compreender a complexidade da estrutura e do desenvolvimento de biofilmes<sup>3</sup>.

A formação do biofilme inicia-se quando células planctônicas (células de vida livre) são ativadas por mudanças na expressão gênica (sistema “quorum sensing”) e tornam-se capazes de se fixar a praticamente qualquer superfície. Essas bactérias aderidas multiplicam-se e encapsulam as colônias com uma matriz de substância extracelular polimérica (EPS). Entre essas células há a formação de canais que facilitam a difusão dos nutrientes na matriz. A proximidade dessas células facilita a troca de sinais moleculares que regulam o comportamento, a estrutura e a dinâmica dessa comunidade sésil microbiana. Além disso, há gradientes químicos que geram microambientes para diferentes espécies microbianas ou níveis de atividade. Em determinadas condições, como falta de nutrientes ou uso de biocidas, ocorre a cisão de um agregado celular ou a migração de células planctônicas, a fim de colonizar outros ambientes<sup>1</sup> (figura 1).

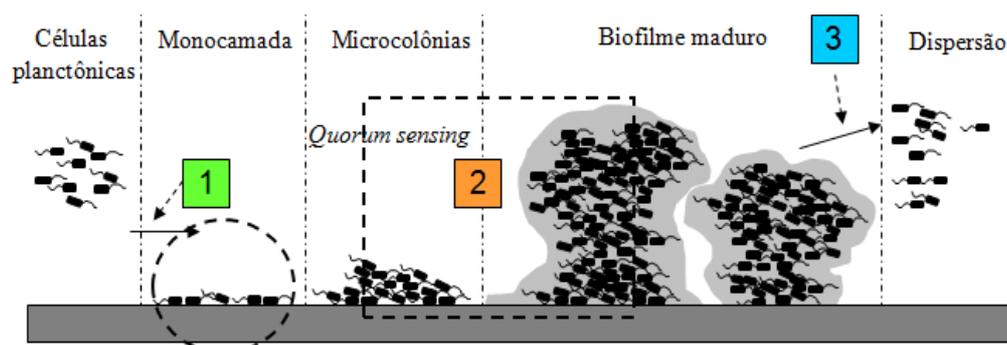


Figura 1: Etapas da formação de biofilme. 1: adesão bacteriana, 2: comunicação celular microbiana, 3: maturação e dispersão (adaptada de Macedo & Abraham, 2009<sup>4</sup>).

O “quorum sensing” (QS) é o sistema de sinalização célula-célula microbiano que correlaciona a expressão gênica com a densidade populacional. Assim, conforme a densidade bacteriana, as células sintetizam sinais moleculares, detectam esses sinais, e por meio de interações moleculares específicas ativam ou inativam genes-alvo<sup>5</sup>. O QS é responsável pelas comunicações intra- e interespecíficas, controlando um grande espectro de fenótipos, incluindo a formação e a virulência do biofilme, bem como a produção de EPS<sup>6</sup>.

Esses sinais moleculares são pequenas moléculas autoindutoras, que pertencem a diferentes classes químicas. As acilhomoserinolactonas (AHL) são a classe mais bem estudada, sendo encontrada apenas em Gram-negativas. Já os oligopeptídeos são autoindutores típicos de Gram-positivas. Ainda, o autoindutor-2 (AI-2) tem sido encontrado tanto em Gram-positivas como em Gram-negativas<sup>5</sup> (figura 2).

Na maioria das bactérias Gram-negativas o sinal é gerado por uma sintase AHL da família de proteínas LuxI, sendo percebido por uma proteína receptora AHL que pertence a família LuxR de reguladores transcricionais. Os autoindutores só se ligam em seus receptores após alcançarem a concentração do limiar crítico. Após essa ligação, há regulação dos genes-alvo, estabelecendo uma retroalimentação positiva<sup>7</sup> (figura 3).

Muitas bactérias Gram-positivas usam peptídeos modificados como sinais para regulação de diversas funções. A maioria desses peptídeos autoindutores é gerada por clivagem de peptídeos precursores e modificações subsequentes, como a formação de anéis lactona e tiolactona. Porém, esses peptídeos precisam ser

transportados por exportadores para o espaço extracelular. A percepção desse sinal é mediada por sensores histidina quinase localizados na membrana citoplasmática<sup>7</sup> (figura 3).

A molécula sinal autoindutor-2, comum a bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, requer a enzima LuxS para sua biosíntese. Já a percepção de AI-2 é dependente da proteína periplasmática ligadora de AI-2 Lux-P e o sensor é LuxQ cinase<sup>7</sup>.

A formação de biofilme é muito favorável para as bactérias. Primeiro, pelo fato das superfícies proverem estabilidade e proximidade; segundo, pela proteção a diversas condições como exposição à luz ultravioleta, a ácidos, à desidratação, à salinidade, à fagocitose e a vários antimicrobianos<sup>1</sup>. Dessa forma, biofilmes são até 1000 vezes mais tolerantes a antibióticos que as células planctônicas, causando infecções graves com alta mortalidade e morbidade<sup>5</sup>. Três fatores têm sido propostos para explicar a alta resistência dos biofilmes:

1°) Propriedades da matriz: a matriz que é composta por polissacarídeos, proteínas, DNA extracelular (DNAe) e vesículas de membrana. Apresenta diversas funções: adesão (permitindo a colonização das superfícies), agregação das células (tornando possível o QS), retenção de água (mantendo o microambiente altamente hidratado), barreira de proteção (conferindo resistência específica e não específica às defesas do hospedeiro, além de tolerar diversos agentes antimicrobianos), absorção de compostos orgânicos e inorgânicos (acumulação de nutrientes), atividade enzimática (digestão de macromoléculas e degradação de EPS, para colonização de outros ambientes) e troca de informação genética (facilita transferência horizontal de genes de resistência)<sup>8</sup>.

2°) Heterogeneidade fisiológica no biofilme: os organismos constituintes do biofilme formam populações heterogêneas com diferentes níveis de atividade, relacionado ao gradiente de concentração de oxigênio, nutrientes e resíduos (figura 4). Assim, mesmo que o antimicrobiano penetre na EPS, algumas células dentro do biofilme permanecem protegidas, devido a sua baixa taxa metabólica (células dormentes)<sup>9</sup>.

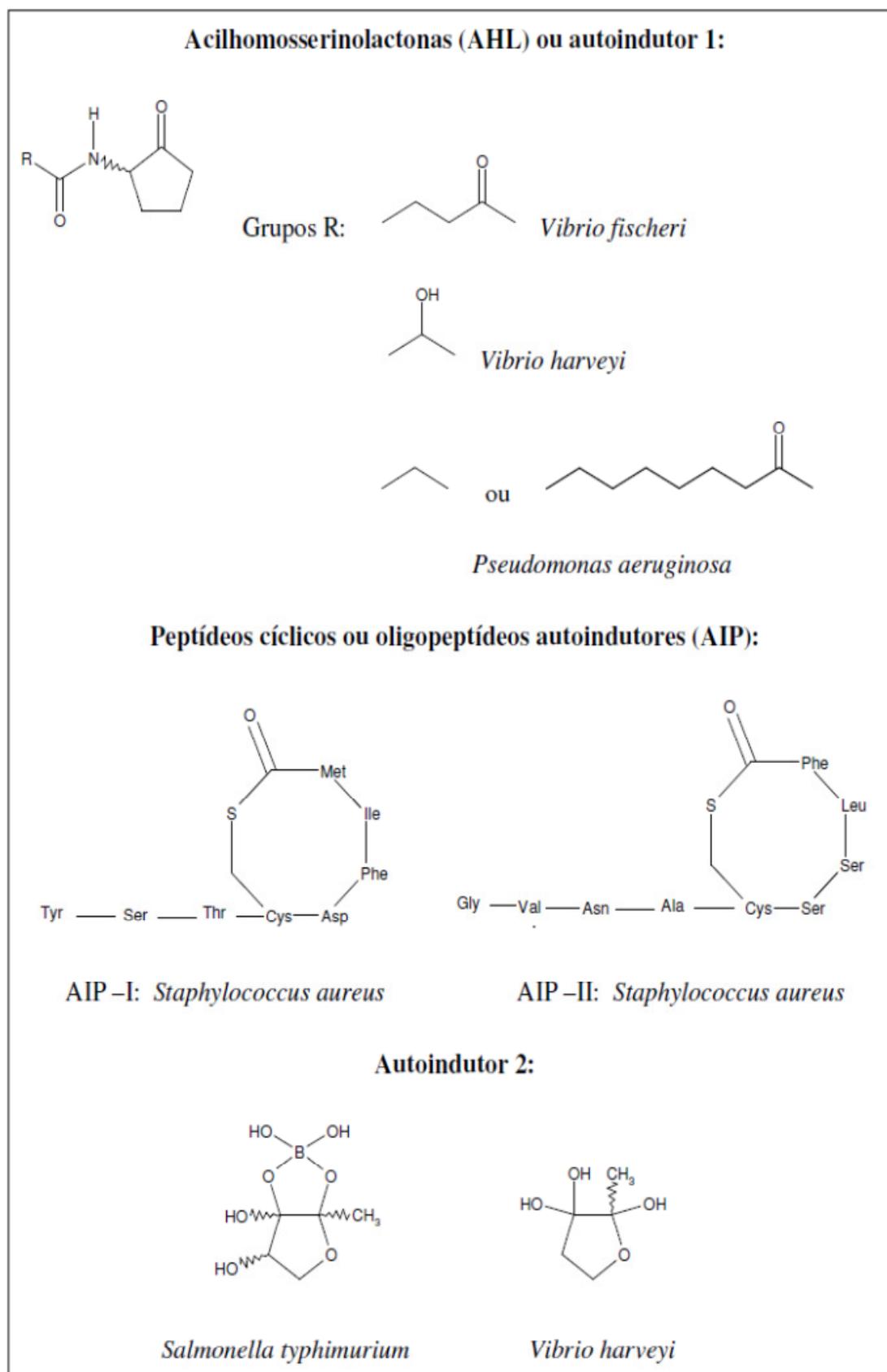


Figura 2: Principais moléculas autoindutoras do sistema QS (adaptada de Ryan & Dow, 2008<sup>7</sup>).

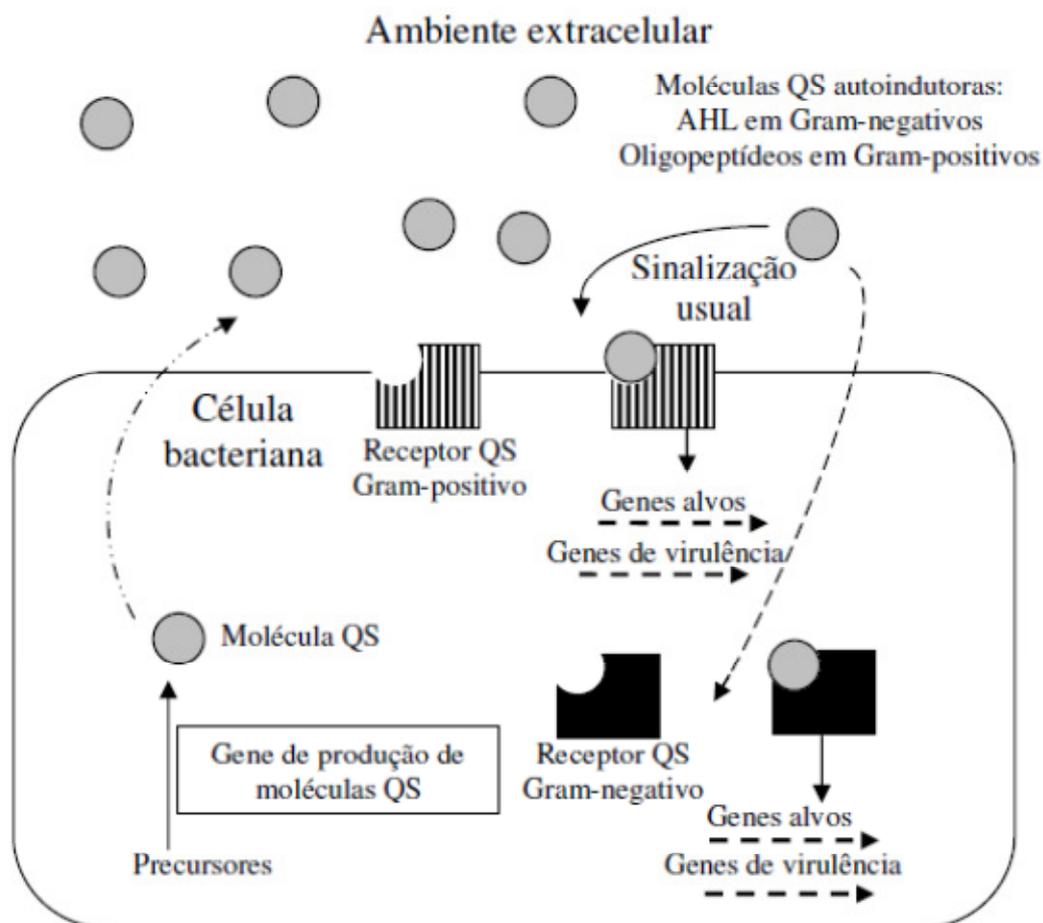


Figura 3: Sistema “quorum sensing” em bactérias Gram-positivas (caixas listradas) e em Gram-negativas (caixas pretas) (adaptada de Macedo & Abraham, 2009<sup>4</sup>).

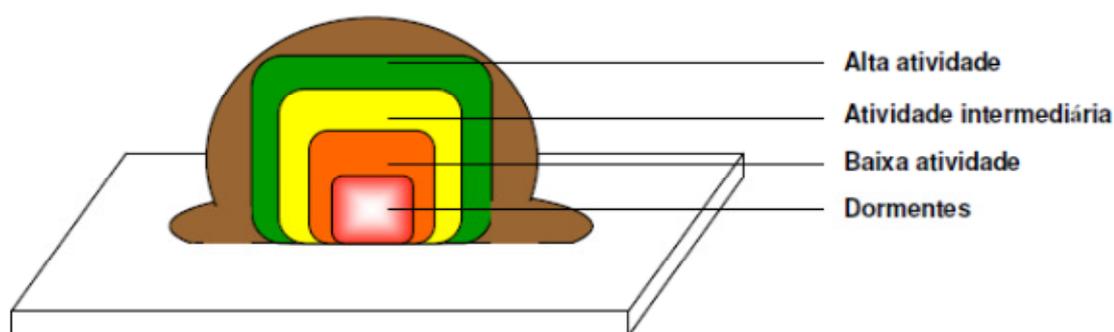


Figura 4: Estado fisiológico do biofilme (adaptada de Davies, 2003<sup>10</sup>).

3º) Subpopulações resistentes (persistentes): biofilmes produzem células persistentes numa taxa de até 10.000 vezes mais alta que as células planctônicas. Essas células são especializadas em mediar a tolerância a diversas drogas, sendo representadas por aproximadamente 0,1 a 10% da população total do biofilme<sup>11</sup>.

De acordo com o Centro de Controle e Prevenção de Doenças dos Estados Unidos (CDC), 65% de todas as infecções são relacionadas a biofilmes, incluindo: endocardites, otites, prostatites, periodontites, conjuntivites, vaginites, infecções relacionadas à fibrose cística (FC) e a implantes médicos (próteses, cateteres venosos, arteriais e urinários). Essas infecções representam um alto custo para o sistema de saúde. As infecções da corrente sanguínea relacionadas a cateter, por exemplo, custam entre US\$5.000 e US\$34.000 por infecção, sendo que a mortalidade varia de 12 a 25%<sup>12</sup>.

## **1.2 Estratégias antibiofilme**

Devido à maior proteção conferida pelo biofilme aos microrganismos, o uso de antimicrobianos é menos eficiente. Em adição, esses medicamentos são utilizados mundialmente tanto no tratamento como na profilaxia de pessoas, de animais e na agricultura, gerando uma pressão seletiva que pode acarretar no desenvolvimento de resistência a esses fármacos<sup>13</sup>. Infecções resistentes a antibióticos duplicam o tempo de estada no hospital e o número de mortes quando comparadas com infecções susceptíveis<sup>14,15</sup>. Essa situação alarmante também ocorre quando o microrganismo causador da infecção é capaz de formar biofilme, o que coloca a vida do paciente em risco e aumenta o custo hospitalar<sup>15</sup>. Portanto, é de grande importância sanitária e econômica a descoberta de moléculas capazes de inibir a formação ou destruir biofilmes já formados, visto que diminui a virulência dos microrganismos e os gastos hospitalares.

Compostos com atividade antibiofilme podem atuar essencialmente em três ocasiões (figura 5):

- (1) Inibição da adesão de microrganismos à superfície;
- (2) Inibição da comunicação celular (“quorum sensing”);
- (3) Dispersão de biofilmes maduros.

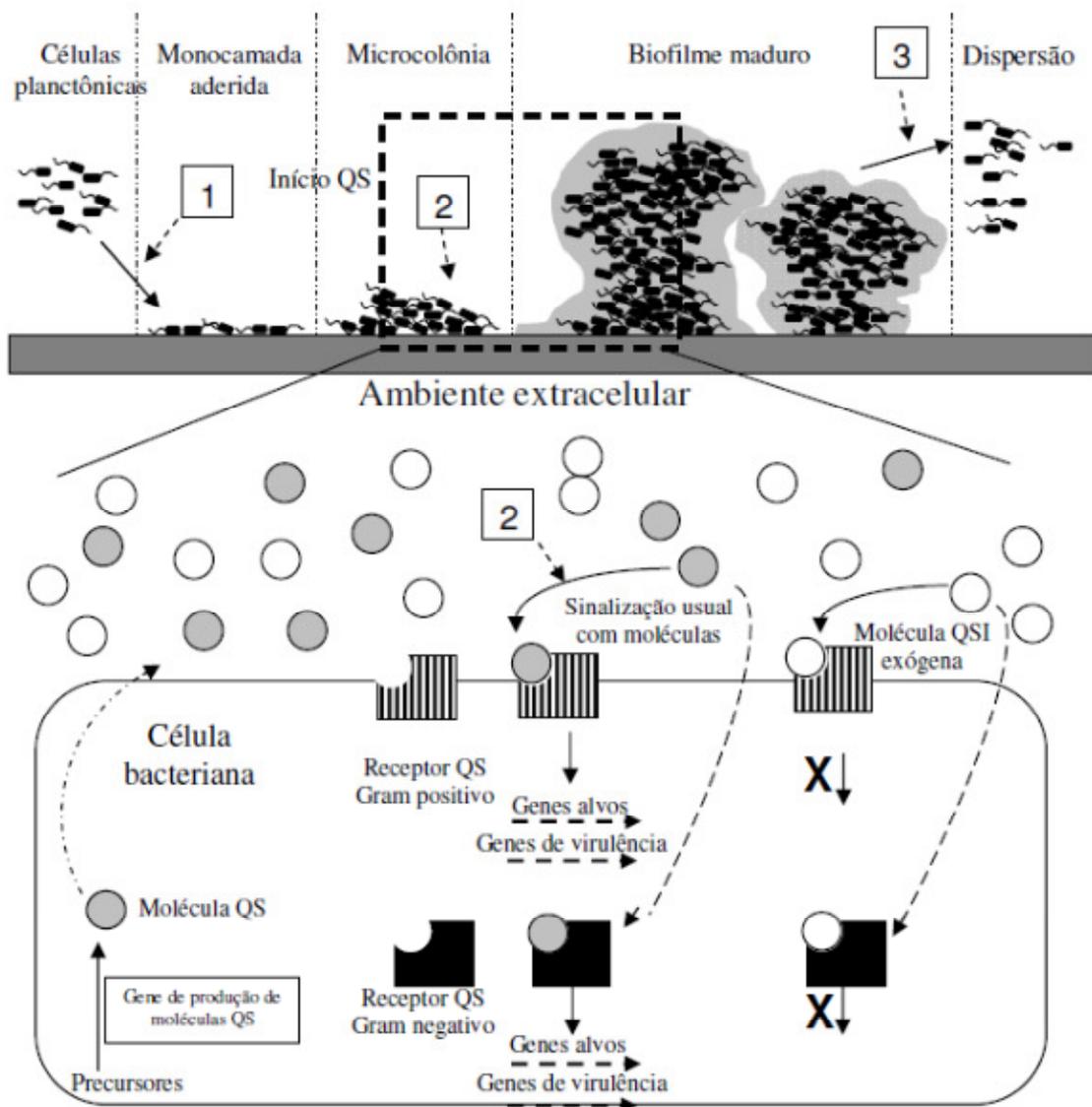


Figura 5: Principais alvos de moléculas antibiofilme. Círculos cinza: representam moléculas autoindutoras QS ligando-se aos receptores QS em bactérias Gram-positivas (caixas listradas) e em Gram-negativas (caixas pretas). Moléculas inibidoras/moduladoras do sistema QS, que competem pelo sítio de ligação das moléculas autoindutoras e evitam a transcrição dos genes de virulência, estão representadas por círculos brancos (adaptada de Macedo & Abraham, 2009<sup>4</sup>).

Para a adesão bacteriana a uma superfície biótica, é indispensável a formação de pili ou fimbria, que são estruturas encontradas em bactérias Gram-positivas e Gram-negativas que se ligam às células do hospedeiro. Assim, a inibição da biossíntese da pili é uma estratégia bastante promissora para antiformação de biofilmes e os compostos com essa atividade são conhecidos como pilicidas<sup>4</sup> (figuras 5 e 6).

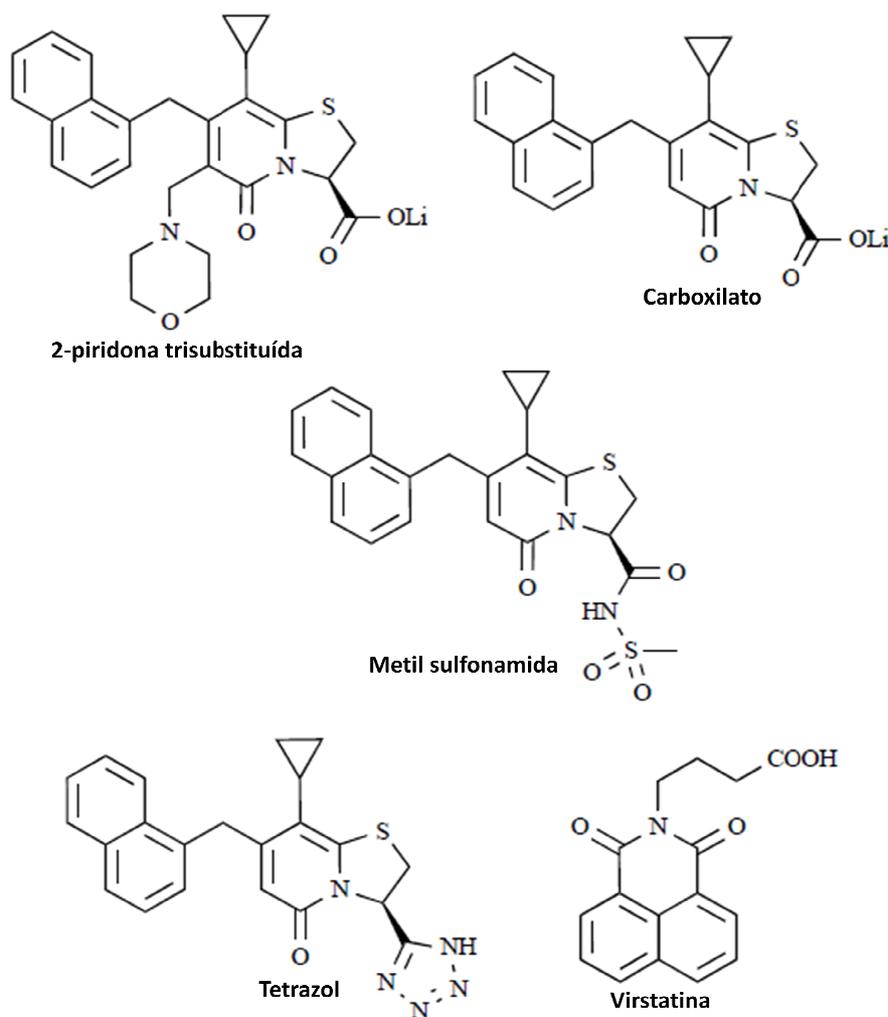


Figura 6: Exemplos de pilicidas, drogas que inibem a formação de pili (adaptada de Macedo & Abraham, 2009<sup>4</sup>).

A inibição da formação de biofilmes em um substrato abiótico pode ser obtida pelo desenvolvimento de superfícies com características físicas de anti-aderência, evitando as interações hidrofóbicas e/ou eletrostáticas que medeiam a adesão primária a essas superfícies<sup>16</sup>. Em adição, essas superfícies podem ser recobertas com compostos inibidores do sistema QS (QSI), capazes de interferir na comunicação inicial bacteriana, não permitindo a adesão dessas bactérias (figura 5 e 7). Essa abordagem tem grande valor no desenvolvimento de dispositivos médicos implantáveis, tais como: cateteres, próteses, válvulas cardíacas, marca-passos, dentre outros, os quais apresentam alto potencial de infecção, por facilitarem a colonização por microrganismos oportunistas<sup>17</sup>.

Devido ao amplo espectro de fenótipos controlados pelo sistema QS, a sua inibição pode ser uma alternativa terapêutica para tratamentos de infecções

microbianas. A interrupção de qualquer um dos passos desse sistema pode levar ao seu bloqueio mesmo após a adesão bacteriana primária, visto que o uso de QSI pode inibir a produção de EPS e dificultar a manutenção da estrutura tridimensional dos biofilmes (figuras 5 e 7).

Para erradicação de biofilmes já formados, o tratamento deve focar na dispersão dos biofilmes. Pode-se utilizar moléculas sinalizadoras que estimulem o mecanismo natural de dispersão de biofilmes, ou usar proteases e outras enzimas capazes de desintegrar a matriz de EPS que encapsula todo o biofilme<sup>18,19</sup> (figura 5). Exemplos de moléculas com essas funções são a dispersina B ( $\beta$ -*N*-acetilglucosaminidase) e o *cis*-2-ácido decenóico (ácido graxo)<sup>20</sup>

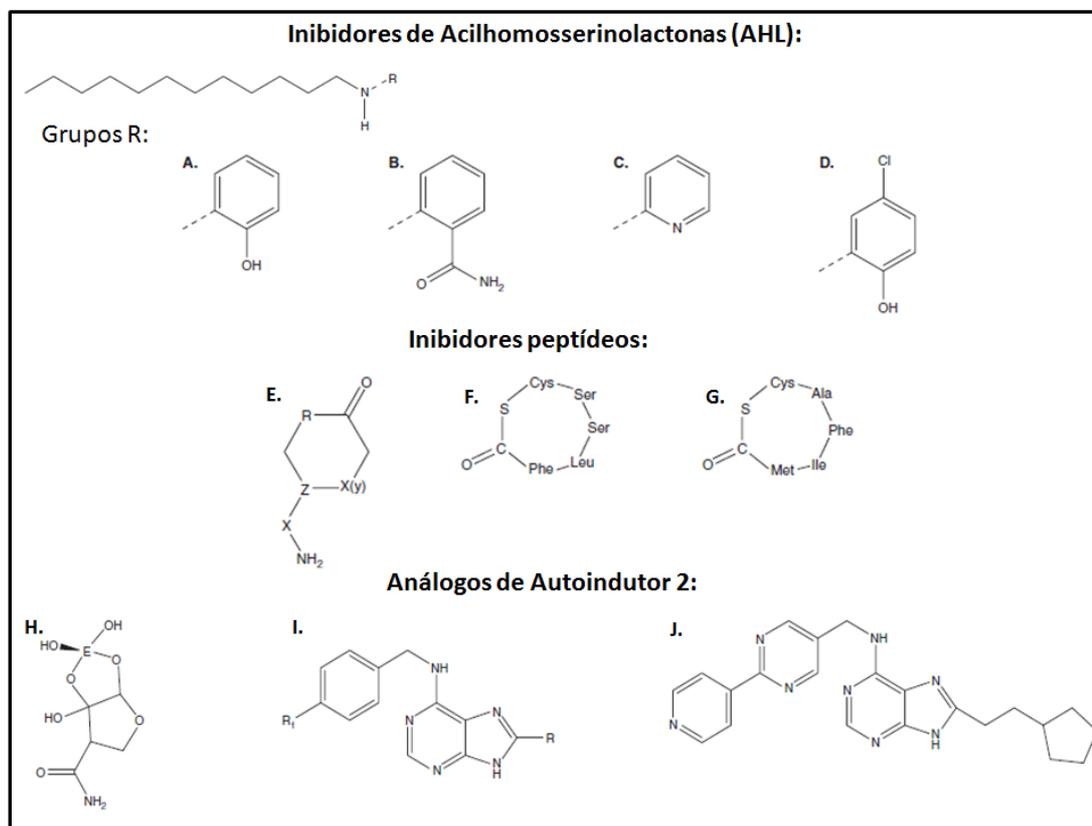


Figura 7: Exemplos de inibidores do sistema “quorum sensing”. A-D: grupos R da forma geral de inibidores de AHL. E: estrutura geral de peptídeos inibidores de QS (R = O, N, S ou C; X: pode ser aminoácido, análogo a aminoácido), F e G: inibidores peptídeos. H-J: análogos de AI-2. Em H, E = B, P ou S. Em I, R =  $(\text{CH}_2)_2\text{C}-\text{C}_5\text{H}_9$  e R1 =  $\text{CO}_2\text{Me}$  ou 4-piridil (adaptada de Pan & Ren, 2009<sup>5</sup>).

### 1.3 Biofilmes de *Staphylococcus epidermidis*

Bactérias do gênero *Staphylococcus* são cocos Gram-positivos, imóveis, não-formadores de esporos, anaeróbios facultativos ou anaeróbios, tipicamente não encapsulados e geralmente catalase-positivos<sup>21</sup>. Atualmente, esse gênero é composto por 37 espécies, dentre as quais 17 são capazes de colonizar o homem, principalmente a pele e as membranas mucosas<sup>21</sup>. Considerando as espécies patogênicas aos humanos, o gênero *Staphylococcus* se divide em espécies coagulase-positivas, cujo representante principal é *S. aureus*, e coagulase-negativas. Nesse segundo grupo, as espécies mais comumente associadas à doença humana são *S. epidermidis*, *S. saprophyticus*, *S. capitis* e *S. haemolyticus*<sup>21</sup>.

*S. epidermidis* (comensal e patógeno) é o mais freqüente agente causador de infecções nosocomiais, representando a causa mais comum de infecções relacionadas a dispositivos médicos<sup>22</sup>. O custo das infecções da corrente sanguínea relacionadas a cateter vascular causadas por *S. epidermidis* é estimado em US\$ 2 bilhões só nos Estados Unidos, visto que o tratamento é complicado devido à resistência a antibióticos e à formação de biofilme<sup>22</sup>.

*S. epidermidis* apresenta grande adaptação para o modo de crescimento como biofilme, incluindo “down regulation” de processos celulares básicos como biossíntese de proteínas e ácidos nucleicos<sup>22</sup>. A adesão a superfícies abióticas como cateteres é principalmente governada pela hidrofobicidade da superfície celular bacteriana. Um grupo de proteínas de superfície que medeia essa adesão são as MSCRAMMs (moléculas adesivas da matriz reconhecedoras de componentes da superfície microbiana), sendo a SdrG, uma proteína ligadora ao fibrinogênio, a representante mais estudada<sup>22</sup>.

Após a adesão inicial, começa a agregação intercelular mediada por exopolissacarídeos, proteínas, ácido teicóico e DNAe (originário das células lisadas). Muitas cepas de *S. epidermidis* produzem o homopolímero poli-*N*-acetilglucosamina (PNAG ou PIA), fundamental para formação de biofilme. Esse polímero é codificado pelo operon *ica* contendo os genes *icaADBC*<sup>23</sup>. Mesmo sendo fundamental à formação de biofilme, cepas sem os genes *ica* podem formar biofilme. Também tem sido reportado que genes *ica* podem falhar na formação de biofilme se ocorrer uma aderência inicial prejudicada<sup>1</sup>.

A dispersão do biofilme é controlada pelo sistema *agr* de QS que consiste em peptídeos auto-indutores. Porém, essa atividade de *agr* é limitada a superfície do biofilme, indicando que existem outros mecanismos responsáveis por esse processo, por exemplo, a degradação enzimática dos exopolímeros e o rompimento das interações não covalentes por moléculas semelhantes a detergentes.

#### 1.4 Biofilmes de *Pseudomonas aeruginosa*

Bactérias do gênero *Pseudomonas* são bastonetes Gram-negativos, aeróbios, catalase-positivos, geralmente móveis (um ou mais flagelos polares), não-formadores de esporos, não-fermentadores de glicose e não-fastidiosos<sup>24</sup>. Esse grande e complexo gênero possui espécies de importância clínica e ambiental, sendo ubíquo no ambiente, pois cresce em temperaturas de 4 a 42 °C e utilizam diversas fontes de carbono<sup>24</sup>.

*P. aeruginosa* (patógeno oportunista) contribui, significativamente, para a morbidade e a mortalidade associada à FC, doença autossômica recessiva mais comum entre os caucasianos, cuja frequência é de 1:2500 nascidos vivos<sup>25</sup>. Além de estar envolvida em diversas outras enfermidades, como, por exemplo, meningite (geralmente seguida por trauma ou cirurgia), otite externa em diabéticos, endocardite ou osteomielite em pacientes com medicação endovenosa, pneumonia, infecções no trato urinário e peritonites<sup>24</sup>.

A formação de biofilme em *P. aeruginosa* pode ocorrer por adesão do microrganismo às superfícies ou por formação direta de biofilmes em matriz espessa sem necessidade de contato com superfície, como é o caso do muco nos portadores de FC<sup>25</sup>. A adesão de *P. aeruginosa* a superfícies é dependente de vários fatores, incluindo flagelo, pili tipo IV, fimbria, DNAe e polissacarídeo Psl. Além disso, o gene *sad B* regula a frequência com que as células dessa bactéria ligam-se e desligam-se a superfícies<sup>26</sup>.

Após a adesão, *P. aeruginosa* pode secretar uma série de exopolissacarídeos, destacando-se o acetiladopolissacarídeo conhecido como alginato, um polímero de ácido manurônico e ácido glicurônico, principalmente produzido nas infecções crônicas nos pulmões de pacientes com FC<sup>27</sup>. Também são produzidos o

polissacarídeo Pel (rico em glicose) e o polissacarídeo Psl (rico em manose). Outros importantes componentes da matriz são DNAe, lectinas e proteínas CdrA.

O sistema QS de *P. aeruginosa* é mediado por três sistemas interconectados: sistema Las que detecta 3-oxo-C12-homoserinolactonas; sistema Rhl que detecta C4-homoserinolactonas e sistema Pqs que detecta quinolonas<sup>26</sup>. A dispersão pode ocorrer devido a vários mediadores, como, por exemplo, óxido nítrico (indução da atividade de fosfodiesterase), ramnolípídeo (ação biosurfactante) e ácido *cis*-2-decenóico (produzido pela própria *P. aeruginosa*)<sup>26</sup>.

## 1.5 Antártica

A Antártica, o continente mais extremo e isolado do planeta, apresenta condições desafiadoras para sobrevivência de microrganismos nativos, como baixas temperaturas, altas altitudes, ventos fortes, baixos níveis de nutrientes, baixa e transiente precipitação, limitada umidade, rápida drenagem, grande exposição à irradiação UV e ciclos de gelo e degelo<sup>28,29,30</sup>. Já a Península Antártica recebe material do mar, de aves e de mamíferos, sendo o clima fortemente influenciado por áreas de baixa pressão, tendo uma taxa de precipitação que excede a de evaporação e uma temperatura anual média de -1,8 °C<sup>31,32</sup>.

À noroeste dessa península está localizada a Ilha Rei George, com uma área de 1300 km<sup>2</sup>, sendo mais de 90% coberto por gelo e neve, com forte influência glacial<sup>33</sup>. Ela é a maior das ilhas Shetland do Sul que é constituída de rochas vulcânicas e plutônicas<sup>34</sup>. A Baía do Almirantado, localizada na ilha Rei George, é a maior enseada das Ilhas Shetland do Sul, tendo uma área de 131 km<sup>2</sup> e uma profundidade máxima de 530 m<sup>35</sup>. Essa baía apresenta características de um fiorde com 3 entradas, Ezcurra (sul-oeste); Mackellar (norte) e Martel (norte-leste)<sup>35</sup>, além de hospedar três estações de pesquisa, Arctowski (Polônia), Ferraz (Brasil) e Machu Picchu (Peru)<sup>36</sup>.

Microrganismos, o recurso mais rico de novos compostos bioativos, são os componentes de biomassa dominante dos ecossistemas da Antártica<sup>37,38</sup>. Devido à adversidade do clima, esses microrganismos desenvolvem diversas estratégias de sobrevivência, como, por exemplo, interações antagonistas interespecíficas que

podem acarretar na liberação de compostos com atividade antimicrobiana e potencialmente antibiofilme<sup>39</sup>.

Na literatura, são relatadas bactérias isoladas de solo Antártico com efeito antibiótico frente a microrganismos de origem alimentar em baixas temperaturas<sup>40</sup>. Mojib *et al.*<sup>29</sup> mostra que pigmentos de bactérias provenientes de lagos Antárticos, têm atividade antimicrobiana contra *Mycobacterium tuberculosis*. Por fim, Lo Giudice *et al.*<sup>39</sup> descreve interações inibitórias entre bactérias isolados do mar Antártico.

Entretanto, bactérias que produzam compostos com atividade antibiofilme ainda não foram relatadas. Porém, considerando que moléculas com essas funções antibiofilme são geralmente metabólitos secundários secretados por diversos microrganismos, quando submetidos a algum tipo de estresse como, por exemplo, a competição entre eles e a adversidade do clima, pode-se hipotetizar que os organismos psicrófilos (incapazes de se desenvolver acima de 20 °C) e psicrotróficos ou psicrotolerantes (crescem a 0 °C, mas possuem ótimo de crescimento acima de 20 °C) são potenciais fontes de compostos antibiofilme.

## 2. Objetivos

O presente trabalho tem como objetivo realizar a bioprospecção de compostos com atividade antibiofilme a partir de microrganismos isolados da ilha Rei George. São os objetivos específicos:

- (i) Rastrear a atividade antibiofilme e antibiótica em coleção de microrganismos oriundos do ambiente Antártico sobre *S. epidermidis* (ATCC 35984) e *P. aeruginosa* (ATCC 27853);
- (ii) Rastrear a atividade antibiofilme do filtrado oriundo do ambiente antártico mais promissor sobre isolados clínicos patogênicos de *S. epidermidis*;
- (iii) Identificar o isolado mais ativo por seqüenciamento do gene 16S rRNA;
- (iv) Avaliar a ação antibiofilme dos filtrados por microscopia eletrônica de varredura;
- (v) Fracionar via técnicas de cromatografia o extrato obtido a partir do isolado mais ativo.

### **3. Trabalho experimental em formato de artigo científico**

A revista escolhida para submissão do presente trabalho foi *FEMS* (Federation of European Microbiological Societies) *Microbiology Ecology*, cuja primeira publicação foi em janeiro de 1985 e até então já foram publicados 77 volumes sobre temas relacionados à microbiologia. Os trabalhos podem apresentar formas cultiváveis ou não de qualquer tipo de microrganismo.

Esse periódico teve índice de impacto, em 2010, de 3,456 (ISI Journal Citation Reports®, Thomson Reuters, 2010). Suas publicações incluem artigos de pesquisa e revisões.

1 **Bactérias da ilha Rei George produzem compostos antibiofilme**

2

3 Susana de Oliveira Elias<sup>a</sup>, Igor Stelmach Pessi<sup>a</sup> e Alexandre José Macedo<sup>a,b\*</sup>

4

5 <sup>a</sup> Centro de Biotecnologia do Estado do Rio Grande do Sul, Universidade Federal do  
6 Rio Grande do Sul, Av. Bento Gonçalves 9500, CP 15005, 91500-970, Porto Alegre,  
7 RS, Brasil.

8 <sup>b</sup> Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Ipiranga,  
9 2752, 90610-000, Porto Alegre, RS, Brasil.

10

11

12

13 **Palavras-chave:** inibição de biofilme, *Staphylococcus epidermidis*, Antártica,  
14 *Pseudomonas sp*

15

16

17

18

19

20

21

22

23

24

25

26

27

28

29

30

31

---

\* Autor para correspondência: Tel.: +55 51 33086082; fax: +55 51 33087309.  
Endereço de e-mail: alexandre.macedo@ufrgs.br

## 32 **Resumo**

33

34 A formação de biofilme por *Staphylococcus epidermidis* e por *Pseudomonas*  
35 *aeruginosa* está relacionada a infecções hospitalares mais resistentes, que aumentam  
36 o tempo de hospitalização e o risco de morte do paciente. Em adição, usar  
37 antimicrobianos pode não ser efetivo, devido à proteção que o biofilme exerce.  
38 Assim, o objetivo desse trabalho é buscar compostos antibiofilme em bactérias  
39 isoladas da ilha Rei George (Península Antártica). Realizou-se o cultivo 98 bactérias  
40 da Antártica, para obtenção dos extratos brutos. Ensaio de quantificação de  
41 crescimento bacteriano e de formação de biofilme utilizando *S. epidermidis* e *P.*  
42 *aeruginosa*, foram feitos para analisar a atividade desses extratos. As imagens da  
43 microscopia eletrônica de varredura (MEV) foram usadas para comparar biofilmes  
44 tratados e não-tratados com os extratos. A extração em fase sólida e a cromatografia  
45 em camada delgada foram utilizadas para caracterizar o extrato do isolado S22L2.  
46 73,5% dos filtrados testados apresentaram alguma bioatividade. Em adição, a maioria  
47 dos isolados antárticos mostraram ação (antibiofilme ou antibacteriana) contra *S.*  
48 *epidermidis*. Entretanto, contra *P. aeruginosa* apenas 5,1% desses isolados foram  
49 ativos. O extrato do isolado S22L2 (*Pseudomonas sp*) foi parcialmente purificado,  
50 mostrando como possíveis componentes ativos aminas, aminoácidos e polifenóis,  
51 compostos que vêm sendo descritos como tendo atividade antibiofilme.

52

## 53 **Introdução**

54

55 Com o avanço da medicina, dispositivos médicos como cateteres  
56 intravenosos, marca-passos cardíacos e próteses articulares têm sido cada vez mais  
57 utilizados. Conseqüentemente, tem se observado um aumento no risco intrínseco de  
58 infecções associadas a esses implantes, devido a fatores de virulência relacionados à  
59 formação de biofilme, o que acarreta em aumento no custo do tratamento e no tempo  
60 de hospitalização (Hall-Stoodley *et al.*, 2004). Biofilmes são agregados microbianos,  
61 englobados por uma matriz de substância extracelular polimérica, que se aderem a  
62 superfícies bióticas e abióticas, sendo regulados pelo sistema “quorum sensing”. Esse  
63 sistema realiza a sinalização célula-célula por meio de moléculas autoindutoras,  
64 adaptando a expressão de determinados genes de acordo com a densidade  
65 populacional. Esses sinais moleculares pertencem a diferentes classes químicas,

66 sendo as acilhomoserinolactonas (AHL), presentes em bactérias Gram-negativas, a  
67 classe melhor compreendida atualmente. Além disso, também são conhecidos  
68 oligopeptídeos autoindutores, típicos de bactérias Gram-positivas, assim como o  
69 autoindutor-2 (AI-2), encontrado tanto em bactérias Gram-positivas quanto em  
70 Gram-negativas (Macedo & Abraham 2009).

71 Compostos antibiofilme podem inibir a adesão de microrganismos a  
72 superfícies, por meio do bloqueio da biossíntese de pili e pelo revestimento das  
73 superfícies com moléculas inibidoras do “quorum sensing” (IQS). As moléculas IQS  
74 podem inibir a formação de biofilme em qualquer estágio, inclusive após a fase de  
75 maturação (Macedo & Abraham 2009). Deste modo, a busca por compostos IQS,  
76 geralmente metabólitos secundários secretados por diversos microrganismos, se faz  
77 necessária, visto que infecções originadas por biofilme são até 1000 vezes mais  
78 tolerantes a antibióticos que as causadas por microrganismos de vida livre (Pan &  
79 Ren 2009).

80 A Antártica, continente mais extremo e isolado do planeta, apresenta  
81 condições desafiadoras para sobrevivência de microrganismos nativos, como baixas  
82 temperaturas e baixos níveis de nutrientes (Block *et al.*, 2009). Além disso, os  
83 microrganismos são os componentes de biomassa dominante desses ecossistemas  
84 (Pointing *et al.*, 2009). Dessa forma, devido à adversidade do clima, esses  
85 microrganismos desenvolvem diversas estratégias de sobrevivência, como, por  
86 exemplo, interações antagonistas interespecíficas que podem acarretar na produção  
87 de compostos com atividade antimicrobiana e potencialmente antibiofilme (Lo  
88 Giudice *et al.*, 2007).

89 Esse estudo tem como objetivo realizar a bioprospecção de compostos  
90 antibiofilme e antibacterianos em microrganismos isolados da ilha Rei George,  
91 Península Antártica, com atividade contra *Staphylococcus epidermidis* e  
92 *Pseudomonas aeruginosa*, microrganismos estreitamente relacionados a infecções  
93 por biofilmes.

94

## 95 **Material e Métodos**

96

### 97 *Localização e amostragem*

98 A geleira Wanda localiza-se na costa leste da Baía do Almirantado, ilha Rei  
99 George, Península Antártica (Figura 1). Ela se estende por uma área de 1,63 km<sup>2</sup> e se

100 comunica com a Baía do Almirantado por meio de um lago pró-glacial (da Rosa *et*  
101 *al.*, 2009). Amostras de solo (S4, S5, S6 e S7) e neve (N1, N2, N3, N4 e N5) foram  
102 coletadas próximas à geleira e amostras de água (A1, A2 e A3) foram obtidas do lago  
103 pró-glacial formado pelo derretimento da geleira e da água que flui pela baía (Figura  
104 1). Todas as amostras foram coletadas assepticamente em frascos de polipropileno,  
105 durante a 28ª Expedição Antártica Brasileira (2009-2010) no verão do hemisfério sul,  
106 e mantidas a 4°C até o processamento.

107

#### 108 *Cultivo de microrganismos*

109 Foram utilizados 98 microrganismos isolados de amostras de solo, neve e  
110 água da ilha Rei George, Península Antártica. Para o rastreamento de atividade  
111 antibiofilme e antibacteriana, os isolados foram cultivados em meio líquido (LB,  
112 TSB, PCB, R2A e nutriente, dependendo da origem da amostra) por quatro dias a 25  
113 °C e 150 rpm, em frascos de 250 mL. O isolado S22L2 também foi cultivado em  
114 fermentador de quatro litros (Biostat® B plus, Sartorius Stedim Biotech, EUA), nas  
115 mesmas condições descritas acima. Ao final do tempo de incubação, o cultivo  
116 bacteriano foi centrifugado a 10.000 rpm por uma hora e esterilizado por filtração em  
117 membrana de 0,2 µm, para obtenção dos filtrados bacterianos.

118

#### 119 *Ensaio de anti formação de biofilme e de inibição do crescimento bacteriano*

120 Este ensaio foi realizado conforme Stepanovic *et al.* (2007), com algumas  
121 modificações. Brevemente, em placas de 96 poços, foram adicionados 50 µL de  
122 caldo LB e 100 µL do cultivo de *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 35984) ou de  
123 cepas de *S. epidermidis* formadores de biofilme isoladas de cateter venoso central. A  
124 cada um dos poços também foram adicionados 100 µL dos filtrados bacterianos.  
125 Como controle positivo utilizou-se 100 µL do cultivo de *S. epidermidis* e 150 µL de  
126 água, também foram usados 250 µL de LB como controle negativo para avaliar a  
127 esterilidade do experimento. A inibição do crescimento bacteriano foi verificada por  
128 meio da leitura da densidade óptica a 600 nm no momento da adição dos filtrados e  
129 após incubação a 37 °C, por 24 horas. Para verificação da atividade antibiofilme, as  
130 placas foram lavadas com solução salina 0,9% estéril. Após fixação a 60 °C por uma  
131 hora, as células aderidas foram coradas com cristal violeta 0,4% por 15 minutos, à  
132 temperatura ambiente. O corante ligado às células foi solubilizado em DMSO 99,5%,  
133 sendo a concentração de células aderidas estimada por meio da leitura da densidade

134 óptica a 570 nm. Os ensaios utilizando *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC27853)  
135 foram realizados da mesma maneira, com exceção do tempo de incubação que foi  
136 reduzido para seis horas. Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

137

#### 138 *Microscopia eletrônica de varredura*

139 A visualização da atividade antibiofilme de alguns filtrados bacterianos foi  
140 realizada como descrito por Trentin *et al.* (2011). Resumidamente, *S. epidermidis*  
141 (ATCC 35984) foi cultivado como descrito na seção anterior, na presença de  
142 Permanox<sup>TM</sup> (Nalge Nunc International, EUA) ou de lamínula de vidro. Após 24  
143 horas de incubação a 37 °C, as amostras foram fixadas, desidratadas, secadas e  
144 metalizadas para a visualização em microscópio eletrônico de varredura (JEOL JSM-  
145 6060).

146

#### 147 *Identificação bacteriana*

148 A extração de DNA foi realizada como descrito em Majumdar *et al.* (1991).  
149 Para identificação do isolado, a região 16S do RNA ribossomal foi amplificada  
150 utilizando os primers universais F27 e R1492. Os amplicons foram purificados,  
151 usando o kit de purificação *UltraClean® GelSpin® DNA Extraction* (MO-BIO,  
152 EUA) e o sequenciamento foi realizado com a versão 3.1 do kit *BigDye® Terminator*  
153 *Cycle Sequencing* (Applied Biosystems, EUA). Posteriormente, foi realizada a  
154 eletroforese capilar no analisador genético *ABI PRISM® 3130xl* (Applied  
155 Biosystems, EUA) e as seqüências foram analisadas pela versão 4.1.4 do software  
156 *Sequencher* (Gene Codes Corporation, EUA).

157

#### 158 *Caracterização do extrato*

159 O extrato bruto do isolado S22L2 foi submetido a três processos:

160 (a) autoclavagem, 121 °C por 30 minutos;

161 (b) enzimático, nesse tratamento incubam-se a proteinase K (100 µg mL<sup>-1</sup>) e o extrato  
162 a 37 °C, por 16 horas. Após inativa-se a enzima de duas maneiras: em água fervente,  
163 por 10 minutos ou em PMSF (fluoreto de fenilmetilsulfonil, 1 mM) a 37 °C, por uma  
164 hora;

165 (c) filtração, utilizando-se os filtros de centrífuga Centricon® 3 e 10 (Millipore,  
166 EUA), segundo instruções da bula.

167

168 *Extração em fase sólida (EFS)*

169 A coluna de fase reversa (Bond Elut C18, Agilent, EUA) empacotada com  
170 500 mg de octadecilsilano (C-18) e com capacidade para 6 mL foi ativada com  
171 metanol, metanol:água (50:50) e água. Para a eluição da amostra, utilizou-se água,  
172 metanol:água (50:50), metanol, metanol:clorofórmio (50:50) e clorofórmio. Foram  
173 colhidas frações de 6 mL, o solvente foi evaporado (SpeedVac SPD1010, Thermo  
174 Electron, EUA) e, posteriormente, as amostras foram retomadas em solução aquosa  
175 de DMSO 2%, (concentração de 7,5 mg mL<sup>-1</sup>). Essas amostras foram utilizadas nos  
176 ensaios de atividade biológica.

177

178 *Cromatografia em camada delgada (CCD)*

179 A CCD foi realizada utilizando placas analíticas sílica gel 60 F<sub>254</sub> (Merck,  
180 Alemanha). Como fase móvel, utilizou-se dois sistemas: (a) AAAA (acetato de  
181 etila:água:ácido acético:ácido fórmico - 9:2,3:1:1) e (b) BAW (butanol:ácido acético  
182 glacial:água - 5:1:4). O sistema clorofórmio:metanol (4:1) não permitiu a separação  
183 da amostra (dados não apresentados). Os reveladores utilizados foram: UV-254 nm,  
184 UV-365 nm e vapor de iodo como reveladores universais; ninhidrina, para detectar  
185 aminas e aminoácidos; anisaldeído para terpenóides, fenilpropanóides, esteróides e  
186 saponinas; cloreto férrico e reagente natural seguido de PEG 4000 (polietilenoglicol)  
187 para polifenóis e hidróxido de potássio para cumarinas e antraquinonas.

188

189 **Resultados e Discussão**

190

191 *Rastreamento da atividade antibiofilme e antibiótica*

192 Dos 98 microrganismos utilizados, 67 foram identificados como bactérias  
193 Gram-negativas e 31 como bactérias Gram-positivas. A prevalência de bactérias  
194 Gram-negativas foi observada em todos os tipos de amostra, correspondendo a  
195 61,1%, 82,6% e 71,4% do total de bactérias isoladas de solo, água e neve,  
196 respectivamente. O predomínio de bactérias Gram-negativas em ambientes antárticos  
197 tem sido relatado por diversos estudos (Bowman *et al.*, 1997; Li *et al.*, 2006;  
198 Shrivage *et al.*, 2007).

199 Utilizando o filtrado obtido do cultivo dos isolados antárticos, avaliou-se a  
200 habilidade dos mesmos em inibir a formação de biofilme de *S. epidermidis* e de *P.*  
201 *aeruginosa*, bem como a inibição do crescimento desses microrganismos. Como

202 mostrado na figura 2, 43 filtrados apresentaram ação antibiofilme e 29 ação  
203 antibiótica contra *S. epidermidis* (ATCC35984). Entretanto, apenas 5 filtrados  
204 tiveram atividade antibiofilme e nenhum deles apresentou atividade antibiótica  
205 contra *P. aeruginosa* (ATCC27853). Somente atividades acima de 35% de inibição  
206 são consideradas.

207 Esses resultados demonstram o grande potencial das bactérias do continente  
208 antártico em controlar microrganismos patogênicos, visto que 73,5% dos filtrados  
209 testados apresentaram alguma bioatividade. Destaca-se que a maioria dos isolados  
210 antárticos mostraram ação contra *S. epidermidis*, e que apenas 5,1% dessas bactérias  
211 foram ativas contra *P. aeruginosa*, evidenciando uma maior dificuldade na busca por  
212 moléculas ativas contra essa bactéria.

213 Dentre os 43 isolados antárticos com ação antibiofilme contra *S. epidermidis*,  
214 21 apresentaram atividade superior a 70% (figura 3). Desses destacam-se os isolados  
215 S22L2, S32N4 e S42L1 que além da grande inibição na formação de biofilme, não  
216 interferiram no crescimento bacteriano, indicando um possível novo mecanismo de  
217 ação dos filtrados, que dificultaria o surgimento de resistência bacteriana, visto que  
218 não age como antibiótico.

219 Considerando os 29 filtrados que apresentaram ação antibacteriana contra *S.*  
220 *epidermidis*, sete apresentaram atividade superior a 70% (figura 4). Em relação aos  
221 cinco isolados ativos contra a formação de biofilme de *P. aeruginosa*, a atividade  
222 ficou em torno de 40% (figura 5). Cabe destacar que os isolados N52R1, S32P1 e  
223 A22P1 ativos contra *P. aeruginosa* também apresentam ação antibiofilme contra *S.*  
224 *epidermidis* e que os filtrados S22R1 e N12T1 mostraram-se antibacterianos para  
225 esta bactéria. No material suplementar, encontram-se todos os resultados do  
226 rastreamento da atividade antibiofilme e antibiótica.

227

#### 228 *Atividade do filtrado S22L2 sobre isolados clínicos*

229 O filtrado do isolado S22L2 foi utilizado para testes de inibição de formação  
230 de biofilme de 13 linhagens de *S. epidermidis* isoladas de cateter venoso central,  
231 devido à sua alta atividade antibiofilme observada no rastreamento e à ausência de  
232 efeito no crescimento bacteriano. A susceptibilidade dos isolados clínicos, frente ao  
233 extrato bruto de S22L2 variou de 12 a 92% (figura 6). A grande variabilidade da  
234 susceptibilidade dessas bactérias demonstra que o fato de serem isolados clínicos  
235 oriundos de diferentes pacientes, já é suficiente para torná-las bastante diferenciadas,

236 mesmo sendo provenientes de um ambiente hospitalar. Essa grande heterogeneidade  
237 dos isolados clínicos frente ao mesmo tratamento é também relatada por Antunes *et*  
238 *al.* (2010 e 2011).

239

#### 240 *Microscopia Eletrônica de Varredura*

241 Os isolados S22L2, S32N4 e S42L1, os quais apresentaram alta atividade  
242 antifilme de *S. epidermidis* (ATCC 35984), 73, 78 e 76% de ação,  
243 respectivamente, e pouco efeito sobre o crescimento desse microrganismo, tiveram  
244 seus filtrados selecionados pra visualização por microscopia eletrônica de varredura  
245 (MEV) (figuras 7 e 8).

246 As imagens da MEV mostraram que os biofilmes não tratados (controles)  
247 mostraram-se uniformes, densos e apresentavam matriz (figuras 7A e 8A). Por outro  
248 lado, quando *S. epidermidis* foi submetido ao tratamento com os filtrados houve uma  
249 redução bastante significativa no número de células aderidas e na produção de  
250 matriz, observando-se apenas pequenos agregados ou células isoladas (figuras 7BC e  
251 8BCD).

252 A visualização da ação de extratos sobre biofilmes de distintas origens vem  
253 sendo reportada. Extratos aquosos de plantas da Caatinga inibiram a formação de  
254 biofilme de *S. epidermidis* (ATCC35984) (Trentin *et al.*, 2011), enquanto extratos  
255 metanólicos de *Cassia spectabilis* apresentaram essa mesma ação frente a *Candida*  
256 *albicans* (Sangetha *et al.*, 2009). Por fim, o suco de “cranberry” demonstrou ação  
257 antibiofilme sob cateteres urinários, evitando a colonização por *Proteus mirabilis*  
258 (Morris & Stickler 2001).

259

#### 260 *Identificação do isolado S22L2 e caracterização de seu extrato bruto*

261 O isolado S22L2, identificado por meio do seqüenciamento da região 16S  
262 rRNA como *Pseudomonas* sp., foi cultivado por quatro dias a 25 °C em fermentador  
263 de quatro litros, coletando-se alíquotas a cada 24 horas. A maior atividade  
264 antibiofilme contra *S. epidermidis* (ATCC35984) foi verificada após 48 horas de  
265 cultivo (86% de inibição).

266 Esse extrato mais ativo teve sua atividade aumentada após ser autoclavado, a  
267 inibição de biofilme passou de 86% para 91%. Isso pode ter ocorrido devido à  
268 formação de novos compostos ativos, ou à degradação de algum inibidor. O  
269 tratamento enzimático resultou na diminuição da atividade em cerca de 30%, o que

270 pode ser explicado pelo fato de algum composto de origem peptídica ter sido  
271 degradado, porém esse componente não deve ser o único responsável pela atividade.  
272 Por fim, a separação utilizando Centricon® não foi efetiva, visto que todas as quatro  
273 frações (maior e menor que 10 kDa e que 3 kDa) apresentaram atividade, reforçando  
274 a hipótese da presença de mais de um componente ativo.

275         Esse filtrado com maior atividade foi submetido à extração em fase sólida  
276 (EFS), obtendo-se seis frações, sendo que apenas a fração metanólica apresentou  
277 atividade, inibindo 51% da formação de biofilme por *S. epidermidis* (ATCC35984).  
278 Entretanto, o filtrado bruto apresentava 86% de atividade. Essa redução pode ser  
279 explicada, devido a algum mecanismo sinérgico que tenha sido prejudicado pela  
280 separação da amostra, devido à degradação de algum composto ou ainda à retenção  
281 de algum componente na coluna mesmo após lavagem. A extração líquido – líquido  
282 também foi realizada, porém não se mostrou efetiva (dados não apresentados).

283         Todas as frações obtidas na EFS, incluindo o extrato bruto e a lavagem da  
284 coluna foram submetidas à cromatografia em camada delgada (CCD). Na CCD, a  
285 fração ativa foi positiva para ninhidrina (Rf 0,3), reagente natural (Rf 0,6) e UV-365  
286 nm, tanto se utilizando a fase móvel AAAA quanto BAW, ainda os valores  
287 aproximados de Rf, acima citados, são em relação a ambas fases móveis.

288         A revelação com ninhidrina pode indicar que os compostos com atividade  
289 possuem grupamentos aminas ou aminoácidos (figura 9), sugerindo a presença de  
290 peptídeos. Como mencionado anteriormente, oligopeptídeos são as moléculas  
291 responsáveis pelo sistema de QS de bactérias Gram-positivas. Dessa forma, análogos  
292 dessas moléculas, como aminas e aminoácidos podem perturbar a comunicação  
293 bacteriana e assim inibir a formação de biofilme. A filoseptina-1 é um peptídeo  
294 secretado por anfíbios (Zhang *et al.*, 2010) capaz de inibir a formação de biofilme de  
295 *S. aureus*, via a modulação do sistema QS. Da mesma forma, catelicidinas e  
296 peptídeos sintéticos relacionados também apresentam essa atividade de inibição  
297 (Dean *et al.*, 2011). Em adição, como reportado por Pettit *et al.* (2000), a amida  
298 esteroideal anprocide possui atividade contra isolados clínicos de bactérias Gram-  
299 positivas.

300         Por outro lado, a revelação com reagente natural pode indicar a presença de  
301 polifenóis nos compostos ativos. Os polifenóis, particularmente os flavonóides, têm  
302 sido descritos como efetivos agentes contra bactérias, fungos, vírus e protozoários  
303 (Cowan, 1999; Cushnie & Lamb 2005). O efeito inibitório dos polifenóis na

304 formação de biofilme pode ser devido à capacidade dos fenóis ligarem-se firmemente  
305 a proteínas, formando complexos com proteínas extracelulares e com componentes  
306 da parede celular, causando a inibição da adesão da bactéria a superfícies (Tsuchiya  
307 *et al.*, 1996; Jagtap & Karkera 2000). Exemplos dessa atividade são relatados em  
308 extratos de plantas contra *S. aureus* (Marino *et al.*, 2010) e *Streptococci* (Song *et al.*,  
309 2007).

310 A avaliação com outros reveladores permite descartar a presença dos  
311 compostos terpenóides, fenilpropanóides, esteróides e saponinas (revelados por  
312 anisaldeído), cumarinas e antraquinona (revelados por hidróxido de potássio).  
313 Entretanto, estudos químicos mais avançados de isolamento e purificação são  
314 necessários para identificar os principais componentes funcionais do extrato S22L2,  
315 assim como ensaios adicionais para determinar o mecanismo de ação dos mesmos na  
316 atividade antiformação de biofilme de *S. epidermidis*.

317

### 318 **Agradecimentos**

319

320 CNPq e Laboratório de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de  
321 Farmácia de UFRGS.

322

### 323 **Referências**

324

325 Antunes AL, Bonfanti JW, Perez LR, Pinto CF, Freitas AL, Macedo AJ & Barth A  
326 (2011) High vancomycin resistance among biofilms produced by *Staphylococcus*  
327 species isolated from central venous catheters. *Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de*  
328 *Janeiro* **106**: 51-55.

329

330 Antunes AL, Trentin DS, Bonfanti JW, Pinto CC, Perez LR, Macedo AJ & Barth AL  
331 (2010) Application of a feasible method for determination of biofilm antimicrobial  
332 susceptibility in *staphylococci*. *APMIS* **11**: 873-877.

333

334 Block W, Lewis Smith RI & Kennedy AD (2009) Strategies of survival and resource  
335 exploitation in the Antarctic fellfield ecosystem. *Biological Reviews of the*  
336 *Cambridge Philosophical Society* **3**: 449-484.

337

- 338 Bowman JP, Mccammon SA, Brown MV, Nichols DS & Mcmeekin TA (1997)  
339 Diversity and Association of Psychrophilic Bacteria in Antarctic Sea Ice. *Applied*  
340 *and Environmental Microbiology* **63**: 3068–3078.
- 341
- 342 Cowan MM (1999) Plant products as antimicrobial agents. *Clin Microbiol Rev* **12**:  
343 564-582.
- 344
- 345 Cushnie TP & Lamb AJ (2005) Detection of galangin-induced cytoplasmic  
346 membrane damage in *Staphylococcus aureus* by measuring potassium loss. *J*  
347 *Ethnopharmacol.* **101**: 243-248.
- 348
- 349 Da Rosa KK, Vieira R, Ferrando FJ & Simões JC (2009) Sedimentological and  
350 geomorfological features of the Wanda and Ecology glaciers deglaciation  
351 environment, King George Island, Antarctica. *Pesquisas em Geociências* **36**: 315-  
352 326.
- 353
- 354 Dean SN, Bishop BM & Van Hoek ML (2011) Natural and synthetic cathelicidin  
355 peptides with anti-microbial and anti-biofilm activity against *Staphylococcus aureus*.  
356 *BMC Microbiology* **11**.
- 357
- 358 Hall-Stoodley L, Costerton JW & Stoodley P (2004) Bacterial biofilms: from the  
359 natural environment to infectious diseases. *Nature Reviews Microbiology* **2**: 95-108.
- 360
- 361 Jagtap AG & Karkera SG (2000) Extract of *Juglandaceae regia* inhibits growth, in-  
362 vitro adherence, acid production and aggregation of *Streptococcus mutans*. *J Pharm*  
363 *Pharmacol.* **52** :235-242.
- 364
- 365 Li S, Xiao X, Yin X & Wang F (2006) Bacterial community along a historic lake  
366 sediment core of Ardley Island, west Antarctica. *Extremophiles* **10**: 461-467.
- 367
- 368 Lo Giudice A, Brilli M, Bruni V, De Domenico M, Fani R & Michaud L (2007)  
369 Bacterium-bacterium inhibitory interactions among psychrotrophic bacteria isolated  
370 from Antarctic seawater (Terra Nova Bay, Ross Sea). *FEMS Microbiol Ecol.* **3**: 383-  
371 396.

- 372 Macedo AJ & Abraham WR (2009) Can infections biofilm be controlled by blocking  
373 bacterial communication? *Medicinal Chemistry* **5**: 517-528.  
374
- 375 Majumdar D, Avissar YJ & Wyche JH (1991) Simultaneous and rapid isolation of  
376 bacterial and eukaryotic DNA and RNA: a new approach for isolating DNA.  
377 *Biotechniques*. **1**: 94-101.  
378
- 379 Marino A, Bellinghieri V, Nostro A, Miceli N, Taviano MF & Bisignano G (2010) In  
380 vitro effect of branch extracts of *Juniperus* species from Turkey on *Staphylococcus*  
381 *aureus* biofilm. *FEMS Immunol Med Microbiol* **59**: 470–476.  
382
- 383 Morris NS & Stickler DJ (2001) Does drinking cranberry juice produce urine  
384 inhibitory to the development of crystalline, catheter-blocking *Proteus mirabilis*  
385 biofilms? *BJU International* **88**: 192-197.  
386
- 387 Pan J & Ren D (2009) Quorum sensing inhibitors: a patent overview. *Expert Opinion*  
388 *on Therapeutic Patents* **19**: 1581-1601.  
389
- 390 Pettit RK, Cage GD, Pettit GR & Liebman JA (2000) Antimicrobial and cancer cell  
391 growth inhibitory activities of 3acetoxyl-17 $\beta$ -(L-prolyl)amino-5 $\alpha$ -androstane in  
392 vitro. *Int J Antimicrob Agents* **15**: 299–304.  
393
- 394 Pointing SB, Chan Y, Lacap DC, Lau MC, Jurgens JA & Farrell RL (2009) Highly  
395 specialized microbial diversity in hyper-arid polar desert. *Proc Natl Acad Sci U S A*.  
396 **47**: 19964-19969.  
397
- 398 Sangetha A, Zuraini A, Suryani A & Sasidharan S (2009) In situ TEM and SEM  
399 studies on the antimicrobial activity and prevention of *Candida albicans* biofilm by  
400 *Cassia spectabilis* extract. *Micron* **40**: 439–443.  
401
- 402 Shrivage BV, Dayananda KM, Patole MS & Shouche YS (2007) Molecular  
403 microbial diversity of a soil sample and detection of ammonia oxidizers from Cape  
404 Evans, Mcmurdo Dry Valley, Antarctica. *Microbiological Research* **162**: 15-25.  
405

- 406 Simões JC, Arigony-Neto J & Bremer UF (2004) O uso de mapas antárticos em  
407 publicações. *Pesquisa Antártica Brasileira* **4**: 191-197.  
408
- 409 Song J, Yang T, Chang K, Han S, Yi H & Jeon J (2007) *In vitro* effects of a fraction  
410 separated from *Polygonum cuspidatum* root on the viability, in suspension and  
411 biofilms, and biofilm formation of mutans *streptococci*. *Journal of*  
412 *Ethnopharmacology* **112**: 419–425.  
413
- 414 Stepanović S, Vuković D, Hola V, Di Bonaventura G, Djukić S, Cirković I &  
415 Ruzicka F (2007) Quantification of biofilm in microtiter plates: overview of testing  
416 conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by  
417 *staphylococci*. *APMIS* **8**: 891-899.  
418
- 419 Tsuchiya M, Asahi N, Suzuoki F, Ashida M & Matsuura S (1996) Detection of  
420 peptidoglycan and beta-glucan with silkworm larvae plasma test. *FEMS Immunol*  
421 *Med Microbiol.* **15**: 129-134.  
422
- 423 Trentin DD, Giordani RB, Zimmer KR, Da Silva AG, Da Silva MV, Correia MT,  
424 Baumvol IJ & Macedo & Abraham (2011) Potential of medicinal plants from the  
425 Brazilian semi-arid region (Caatinga) against *Staphylococcus epidermidis* planktonic  
426 and biofilm lifestyles. *J Ethnopharmacol.* 2011, [Epub ahead of print]  
427
- 428 Zhang R, Zhou M, Wang L, Mcgrath S, Chen T, Chen X & Shaw C (2010)  
429 Phylloseptin-1 (PSN-1) from *Phyllomedusa sauvagei* skin secretion: A novel broad-  
430 spectrum antimicrobial peptide with antibiofilm activity. *Molecular Immunology* **47**:  
431 2030–2037.  
432  
433  
434  
435  
436

437 Figura 1: Localização do ambiente estudado. (A) mapa do continente Antártico; (B)  
438 mapa da ilha Rei George, mostrando em destaque a geleira Wanda; (C) foto de  
439 satélite da geleira Wanda, mostrando os pontos de coleta (N = neve, S = solo e W =  
440 água). A e B, adaptado de Simões et al. (2004); C, fornecido pelo Laboratório de  
441 Monitoramento da Criosfera, FURG, Rio Grande, RS, Brasil.

442

443 Figura 2: Atividade biológica dos filtrados obtidos do cultivo das bactérias isoladas.

444

445 Figura 3: Filtrados com maior atividade antiformação de biofilme para *S. epidermidis*  
446 (apenas atividades maiores que 70% foram mostradas); o controle positivo equivale a  
447 100% de formação de biofilme; as barras de erros representam o desvio padrão.

448

449 Figura 4: Filtrados com maior atividade antibiótica para *S. epidermidis* (apenas  
450 atividades superiores que 70% foram mostradas); o controle positivo equivale a  
451 100% de crescimento bacteriano; as barras de erros representam o desvio padrão.

452

453 Figura 5: Filtrados com atividade antiformação de biofilme contra *P. aeruginosa*; o  
454 controle positivo equivale a 100% de formação de biofilme; as barras de erros  
455 representam o desvio padrão.

456

457 Figura 6: Filtrado S22L2 frente a diferentes isolados clínicos, mostrando variável  
458 atividade antiformação de biofilme; o controle positivo equivale a 100% de formação  
459 de biofilme; as barras de erros representam o desvio padrão.

460

461 Figura 7: Imagens de microscopia eletrônica de varredura de *S. epidermidis* em  
462 permanox<sup>TM</sup>. (A) controle positivo para formação de biofilme; (B) presença do  
463 filtrado de S22L2; (C) presença do filtrado de S42L1. Escala utilizada: 700 vezes de  
464 ampliação.

465

466 Figura 8: Imagens de microscopia eletrônica de varredura de *S. epidermidis* em  
467 lamínulas de vidro. (A) controle positivo para formação de biofilme; (B) presença do  
468 filtrado de S32N4; (C) presença do filtrado de S42L1; (D) presença do filtrado de  
469 S22L2. Setas indicam a presença da matriz exopolissacarídica. Escala utilizada:

470 16.000 vezes de ampliação. 1: 700 vezes de ampliação e 2: 3.300 vezes de  
471 ampliação.

472

473 Figura 9: CCDs, as amostras aplicadas foram 1: extrato bruto de S22L2; 2: primeira  
474 fração EFS; 3: fração aquosa; 4: fração metanol:água - 50:50; 5: fração metanólica,  
475 (fração ativa); 6: fração metanol:clorofórmio – 50:50; 7: fração clorofórmio e 8:  
476 lavagem da coluna. A e B: ninhidrina, sendo A: fase móvel AAAA e B: BAW. C e  
477 D: UV-365 nm, sendo C: fase móvel AAAA e D: BAW. Setas pretas apontam para  
478 as possíveis bandas responsáveis pela atividade antibiofilme.

Figura 1

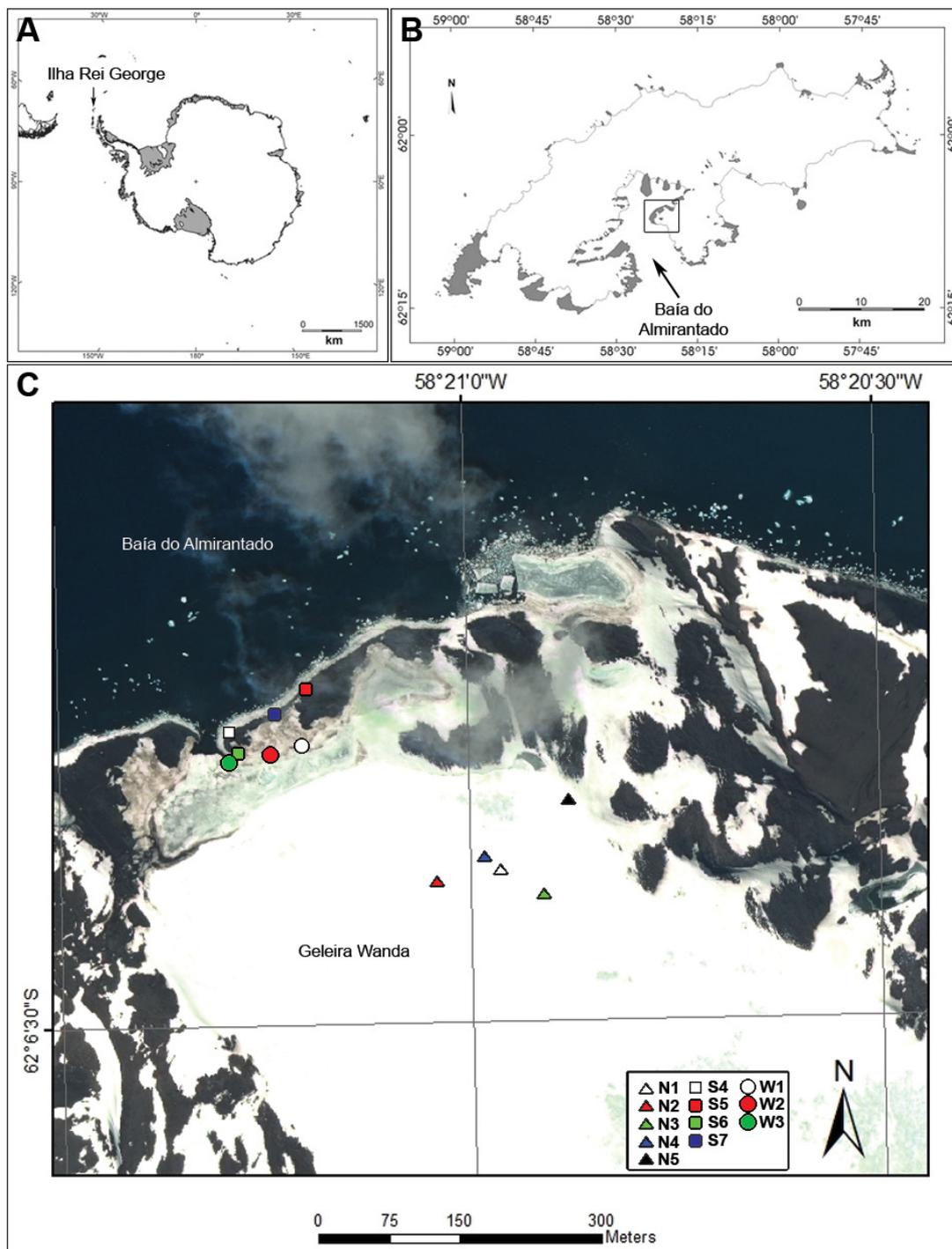


Figura 2

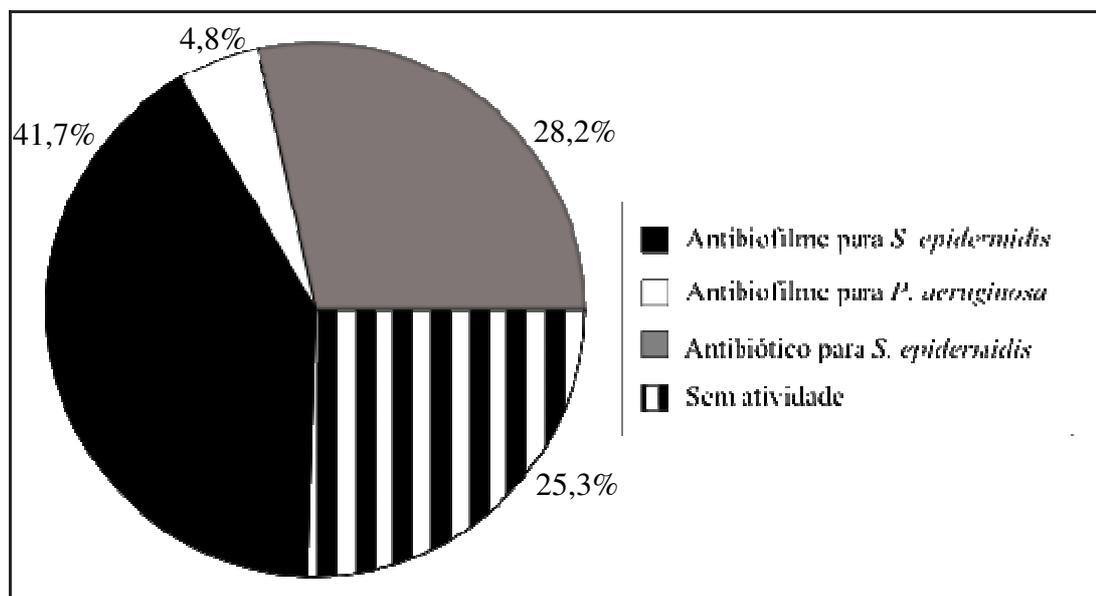


Figura 3

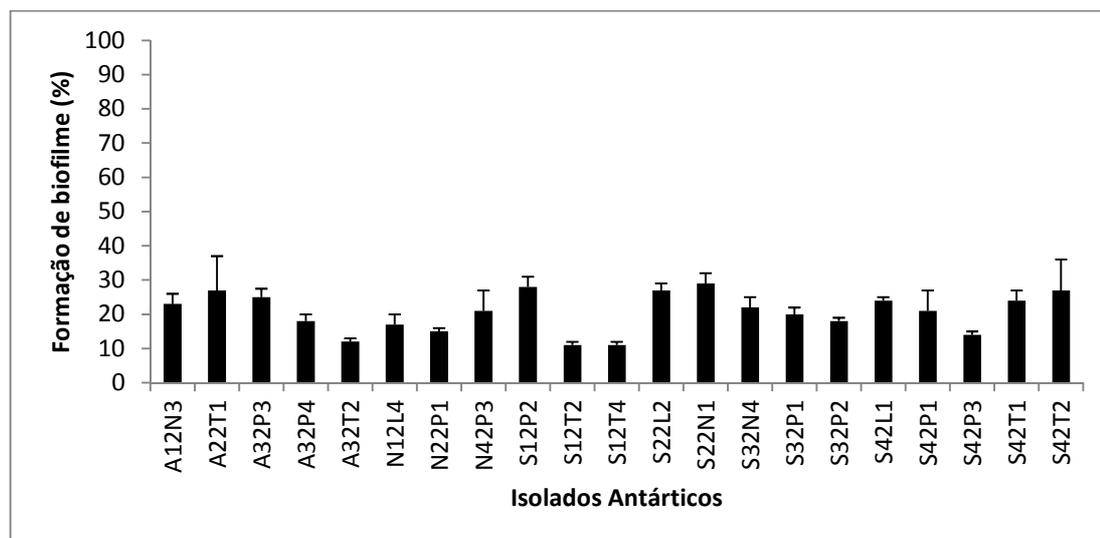


Figura 4

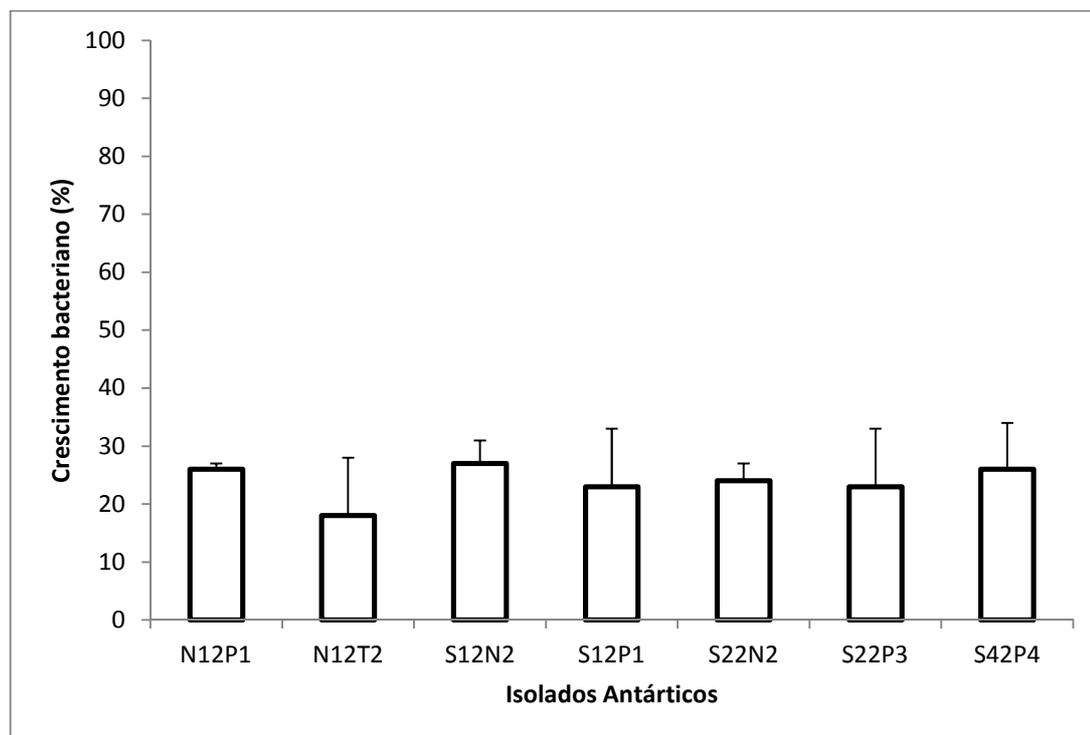


Figura 5

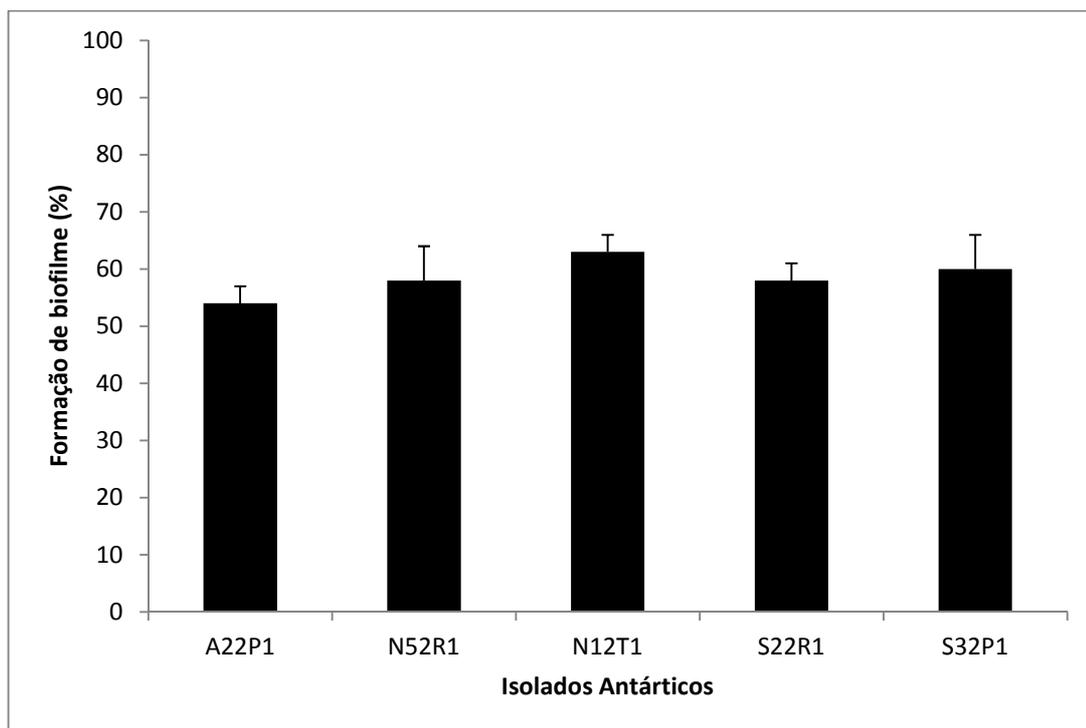


Figura 6

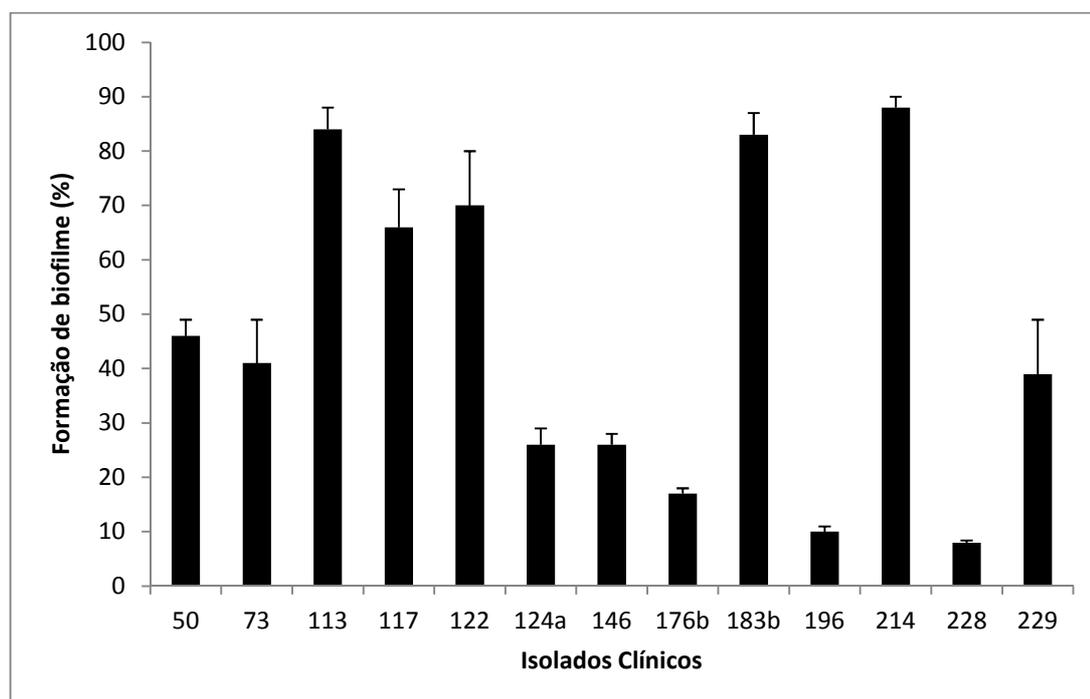


Figura 7

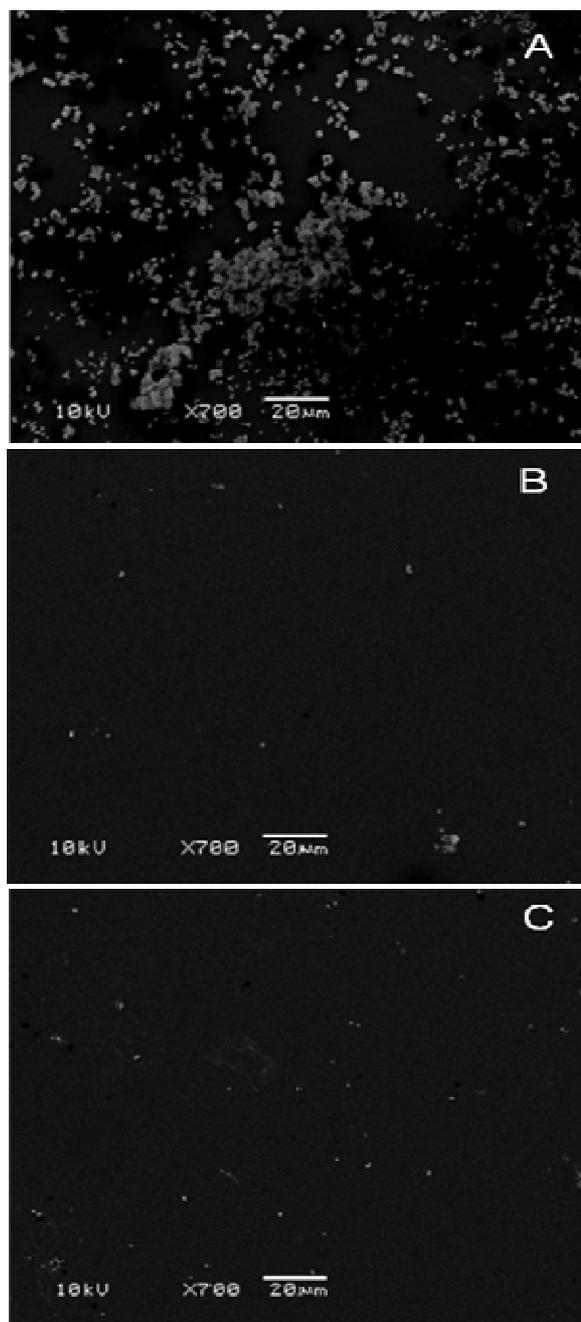


Figura 8

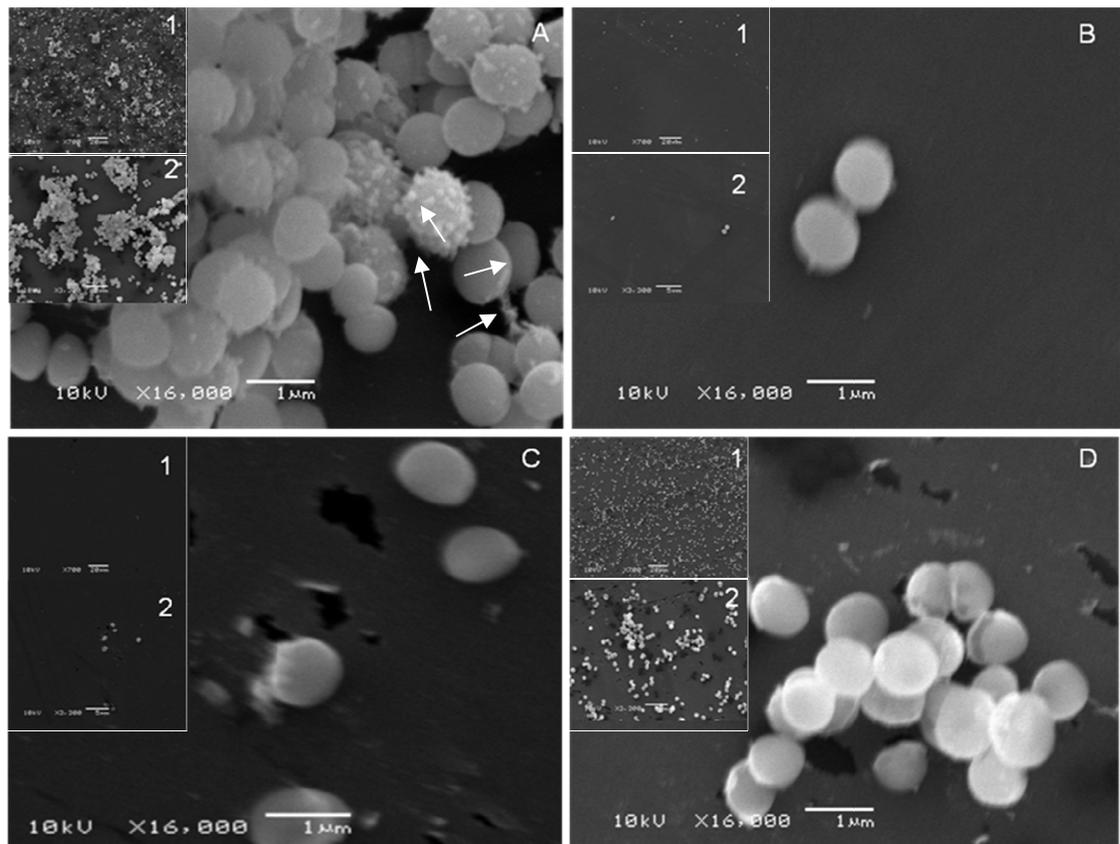
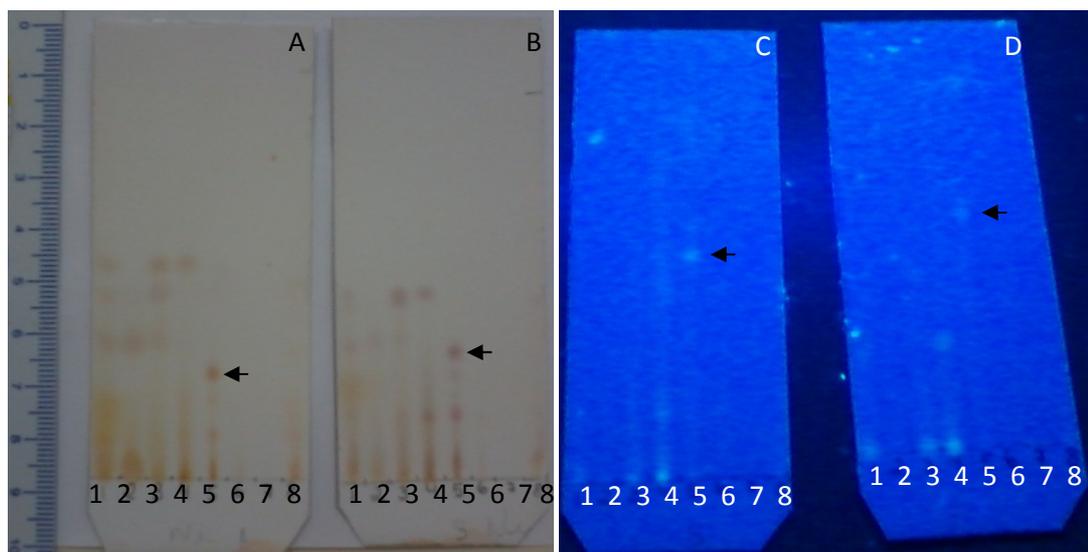


Figura 9



## Material Suplementar

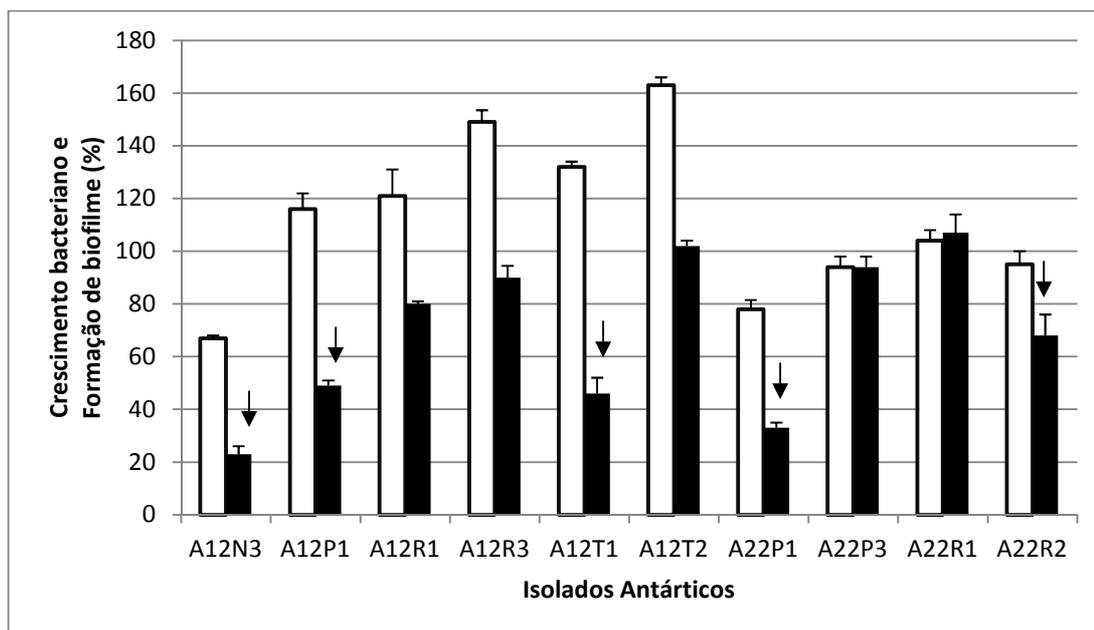


Figura 1: Crescimento bacteriano (barras brancas) e formação de biofilme (barras pretas) de *S. epidermidis* perante filtrados dos isolados antárticos; o controle positivo equivale a 100% de crescimento e de formação de biofilme; as barras de erros representam o desvio padrão (d.p.). Setas apontam para isolados com atividade antibiofilme.

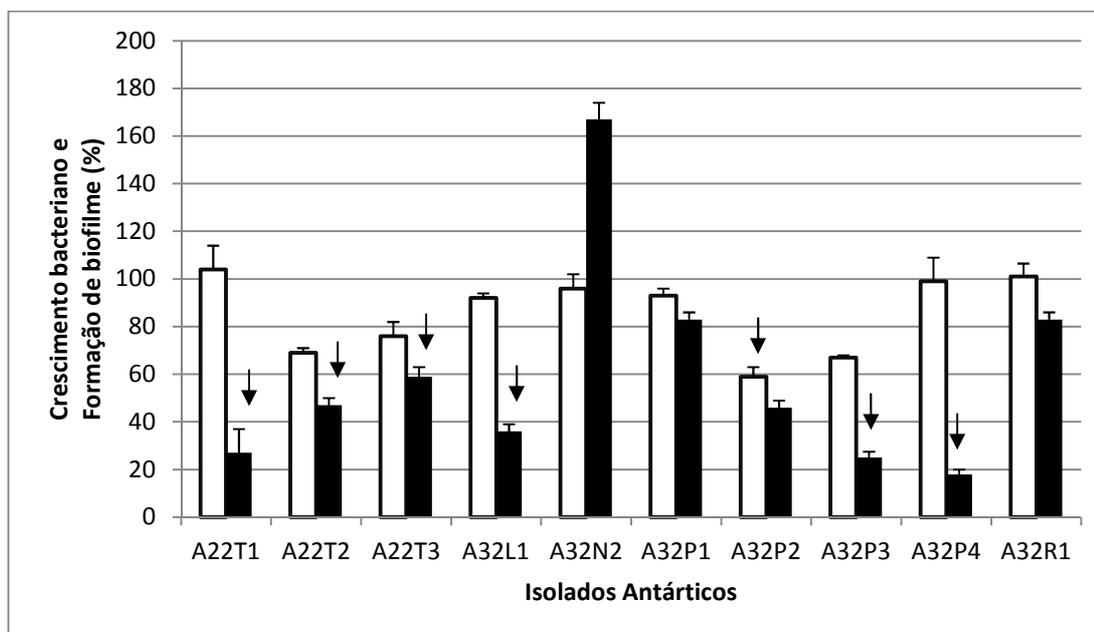


Figura 2: Crescimento bacteriano (barras brancas) e formação de biofilme (barras pretas) de *S. epidermidis* perante filtrados dos isolados antárticos; o controle positivo

equivale a 100% de crescimento e de formação de biofilme; as barras de erros representam o d.p. Setas apontam para isolados com atividade antibiofilme e antimicrobiana.

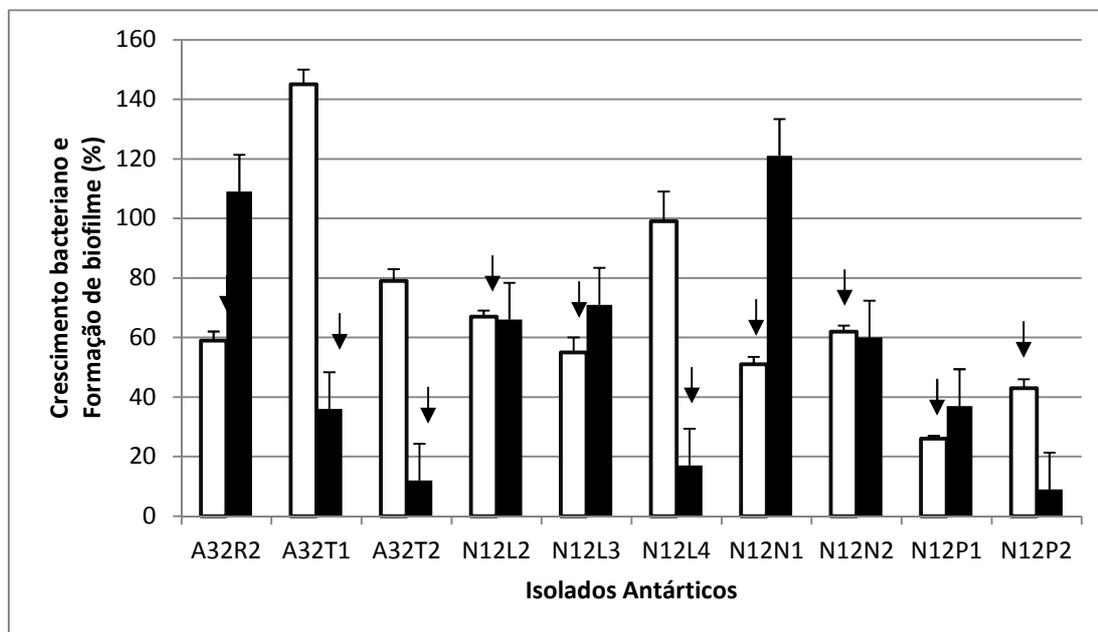


Figura 3: Crescimento bacteriano (barras brancas) e formação de biofilme (barras pretas) de *S. epidermidis* perante filtrados dos isolados antárticos; o controle positivo equivale a 100% de crescimento e de formação de biofilme; as barras de erros representam o d.p. Setas apontam para isolados ativos.

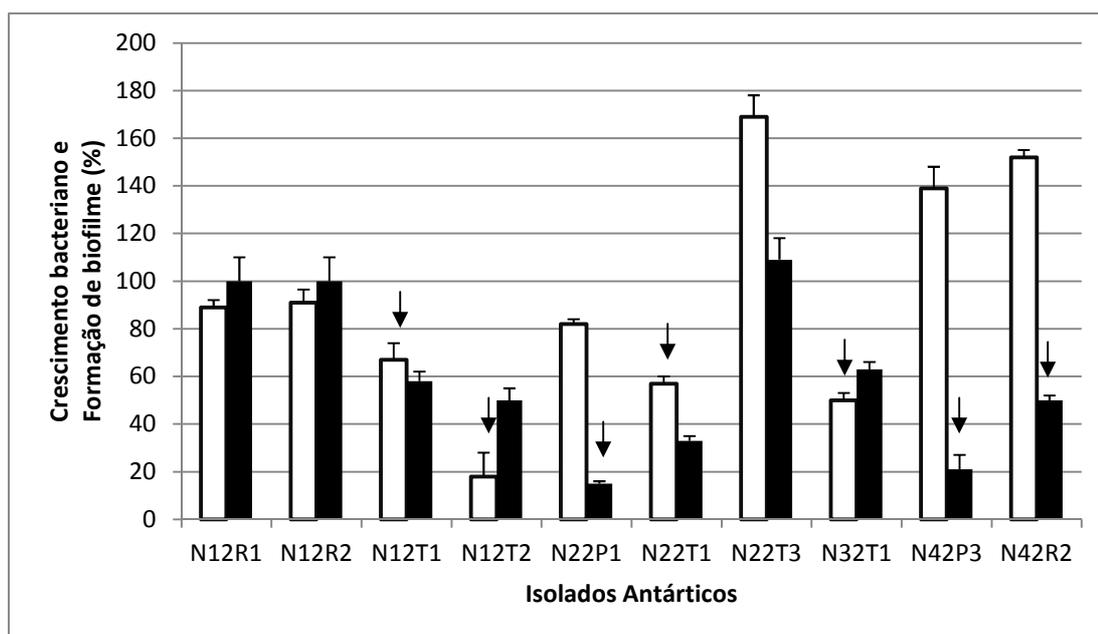


Figura 4: Crescimento bacteriano (barras brancas) e formação de biofilme (barras pretas) de *S. epidermidis* perante filtrados dos isolados antárticos; o controle positivo equivale a 100% de crescimento e de formação de biofilme; as barras de erros representam o d.p. Setas apontam para isolados ativos.

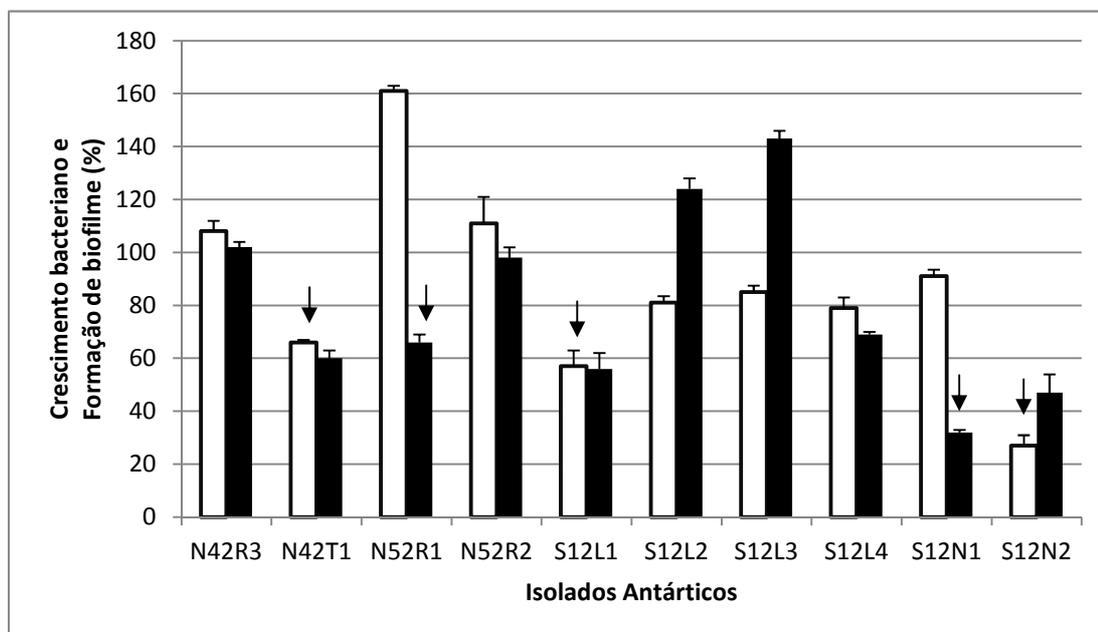


Figura 5: Crescimento bacteriano (barras brancas) e formação de biofilme (barras pretas) de *S. epidermidis* perante filtrados dos isolados antárticos; o controle positivo equivale a 100% de crescimento e de formação de biofilme; as barras de erros representam o d.p. Setas apontam para isolados ativos.

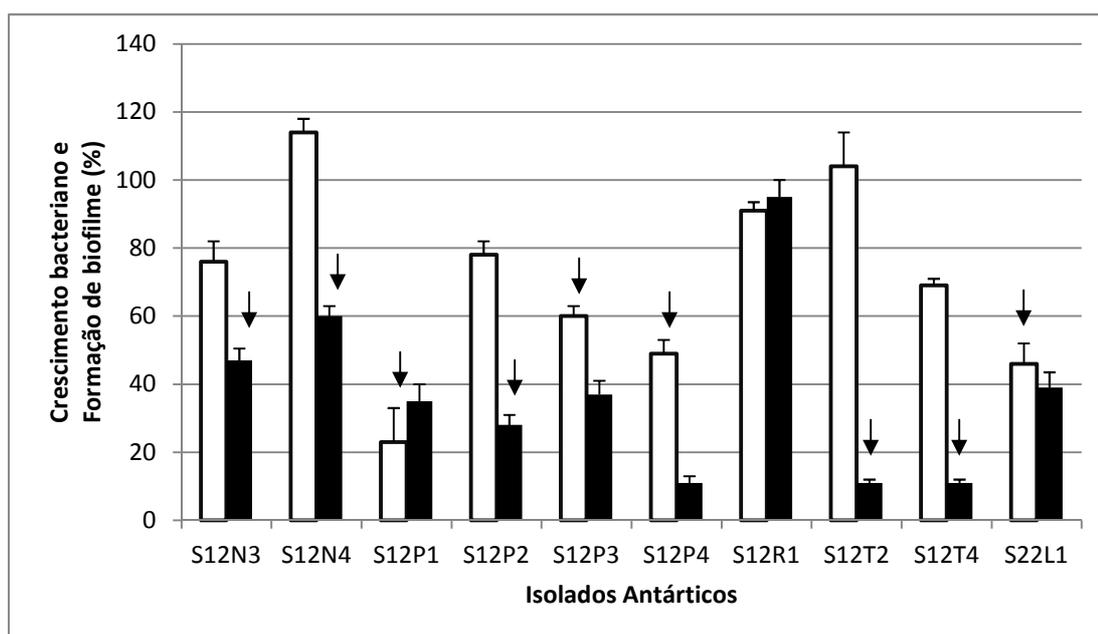


Figura 6: Crescimento bacteriano (barras brancas) e formação de biofilme (barras pretas) de *S. epidermidis* perante filtrados dos isolados antárticos; o controle positivo equivale a 100% de crescimento e de formação de biofilme; as barras de erros representam o d.p. Setas apontam para isolados ativos.

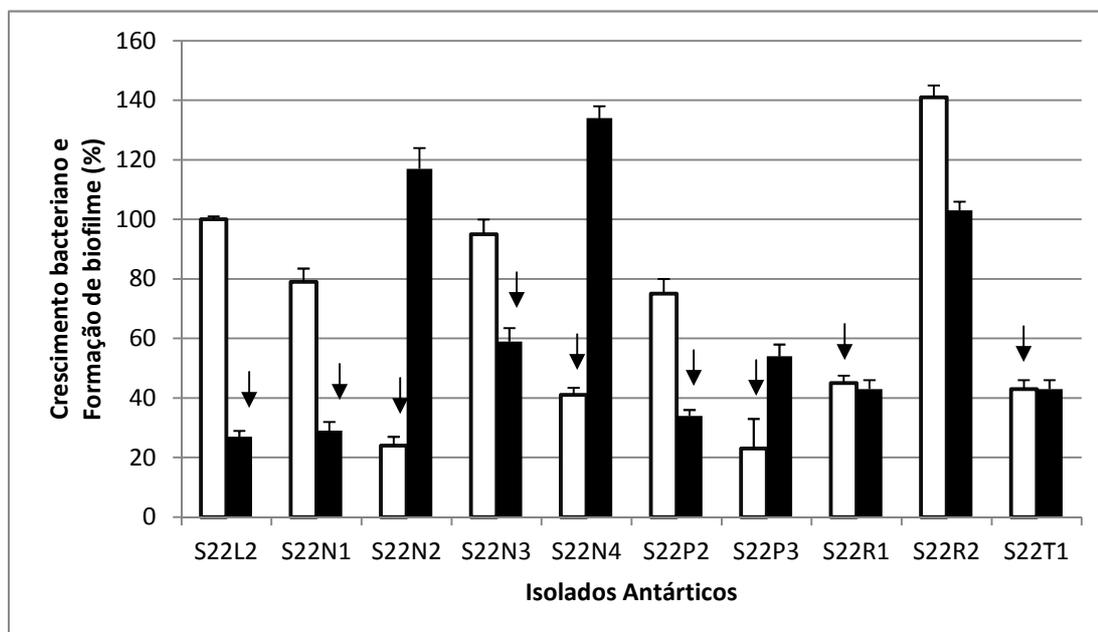


Figura 7: Crescimento bacteriano (barras brancas) e formação de biofilme (barras pretas) de *S. epidermidis* perante filtrados dos isolados antárticos; o controle positivo equivale a 100% de crescimento e de formação de biofilme; as barras de erros representam o d.p. Setas apontam para isolados ativos.

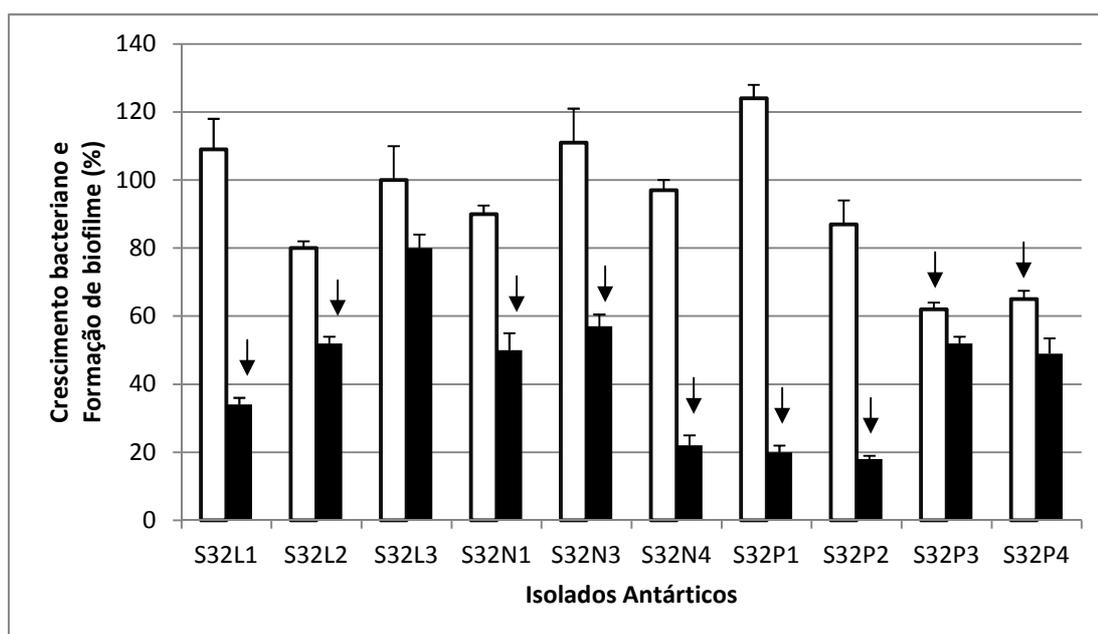


Figura 8: Crescimento bacteriano (barras brancas) e formação de biofilme (barras pretas) de *S. epidermidis* perante filtrados dos isolados antárticos; o controle positivo equivale a 100% de crescimento e de formação de biofilme; as barras de erros representam o d.p. Setas apontam para isolados ativos.

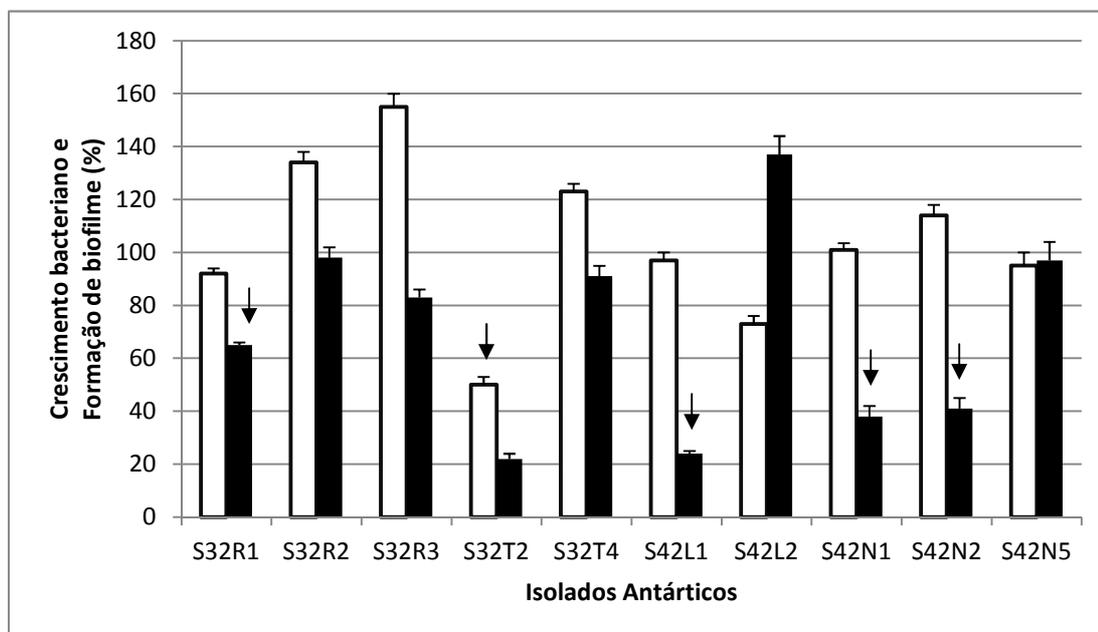


Figura 9: Crescimento bacteriano (barras brancas) e formação de biofilme (barras pretas) de *S. epidermidis* perante filtrados dos isolados antárticos; o controle positivo equivale a 100% de crescimento e de formação de biofilme; as barras de erros representam o d.p. Setas apontam para isolados ativos.

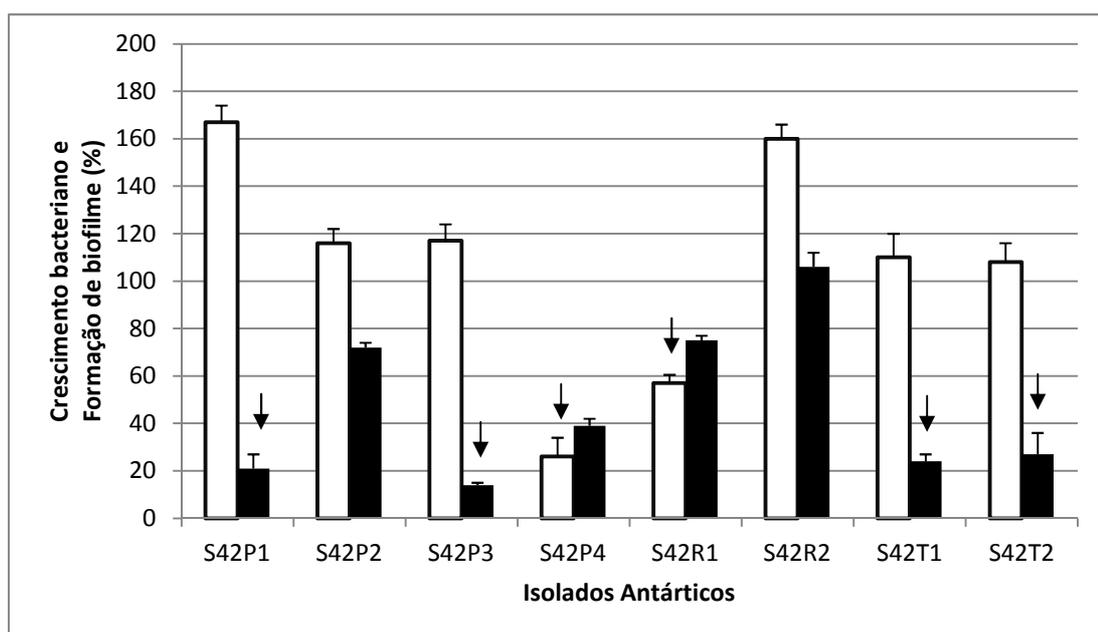


Figura 10: Crescimento bacteriano (barras brancas) e formação de biofilme (barras pretas) de *S. epidermidis* perante filtrados dos isolados antárticos; o controle positivo equivale a 100% de crescimento e de formação de biofilme; as barras de erros representam o d.p. Setas apontam para isolados ativos.

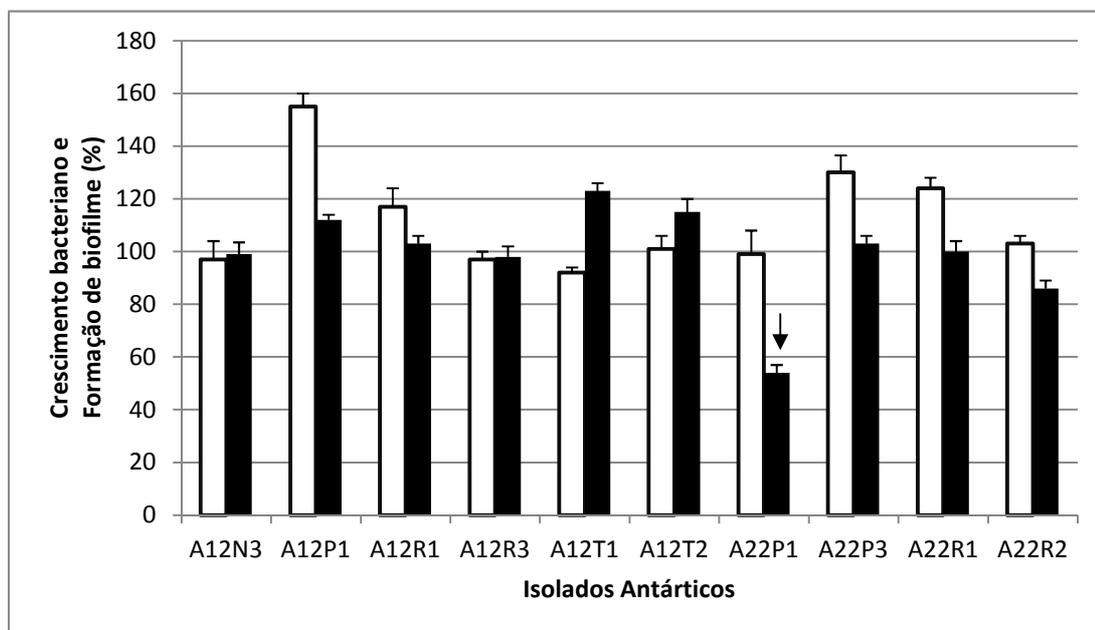


Figura 11: Crescimento bacteriano (barras brancas) e formação de biofilme (barras pretas) de *P. aeruginosa* perante filtrados dos isolados antárticos; o controle positivo equivale a 100% de crescimento e de formação de biofilme; as barras de erros representam o d.p. Seta aponta para isolado com atividade antibiofilme.

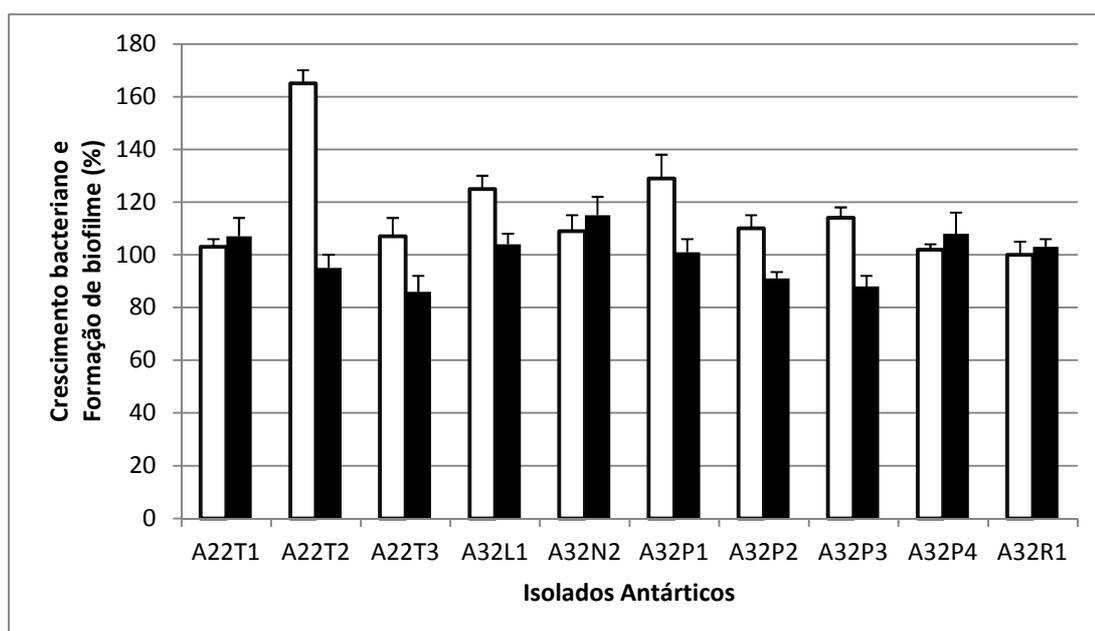


Figura 12: Crescimento bacteriano (barras brancas) e formação de biofilme (barras pretas) de *P. aeruginosa* perante filtrados dos isolados antárticos; o controle positivo equivale a 100% de crescimento e de formação de biofilme; as barras de erros representam o d.p.

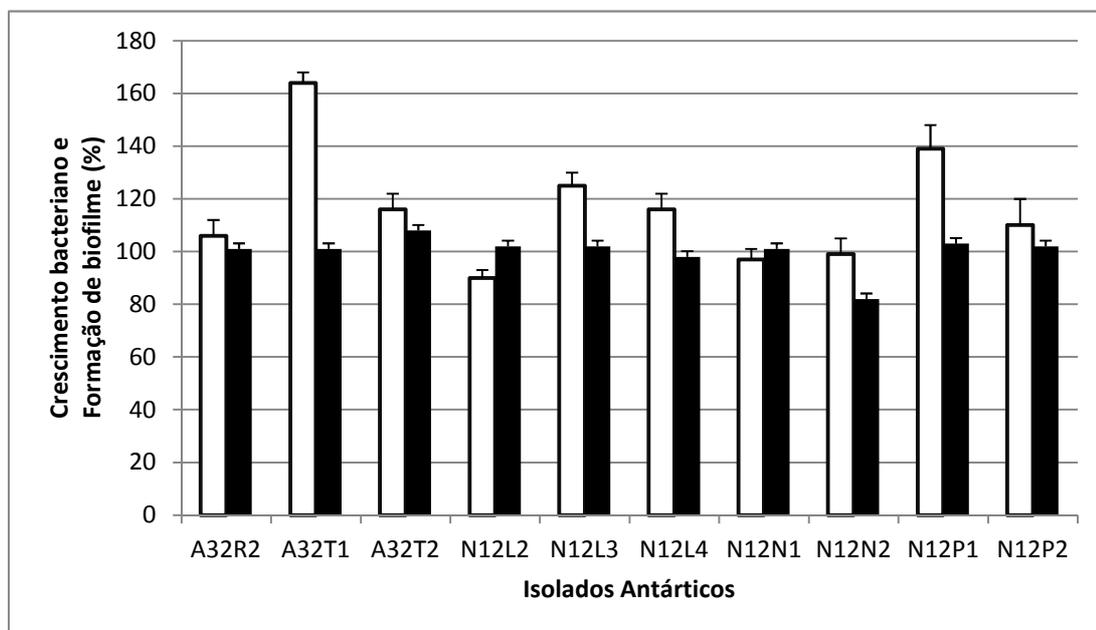


Figura 13: Crescimento bacteriano (barras brancas) e formação de biofilme (barras pretas) de *P. aeruginosa* perante filtrados dos isolados antárticos; o controle positivo equivale a 100% de crescimento e de formação de biofilme; as barras de erros representam o d.p.

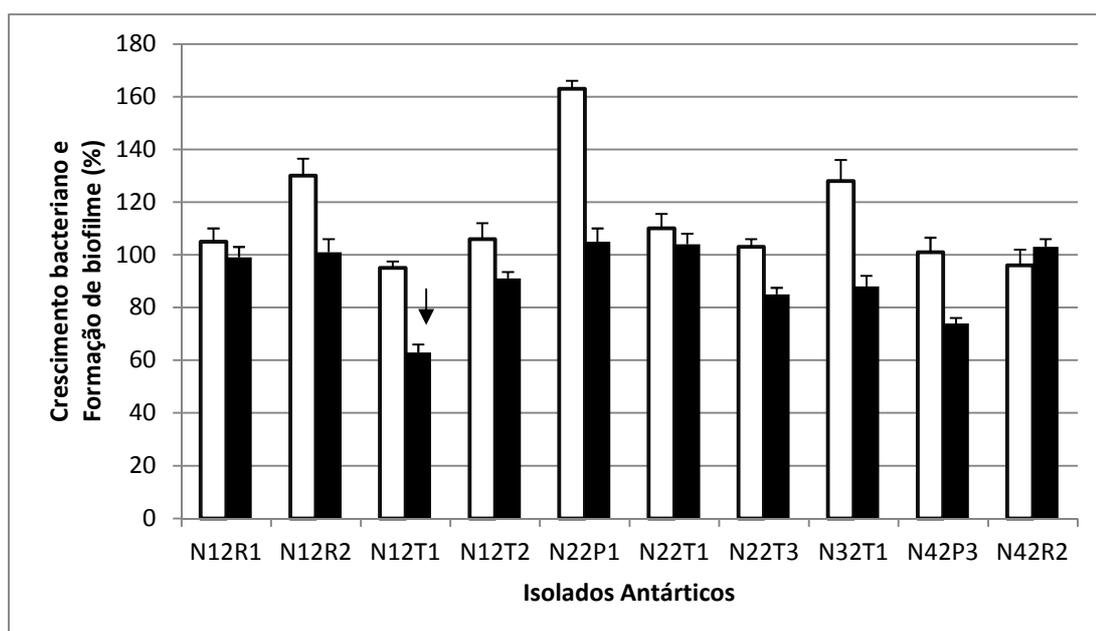


Figura 14: Crescimento bacteriano (barras brancas) e formação de biofilme (barras pretas) de *P. aeruginosa* perante filtrados dos isolados antárticos; o controle positivo equivale a 100% de crescimento e de formação de biofilme; as barras de erros representam o d.p. Seta aponta para isolado com atividade antibiofilme.

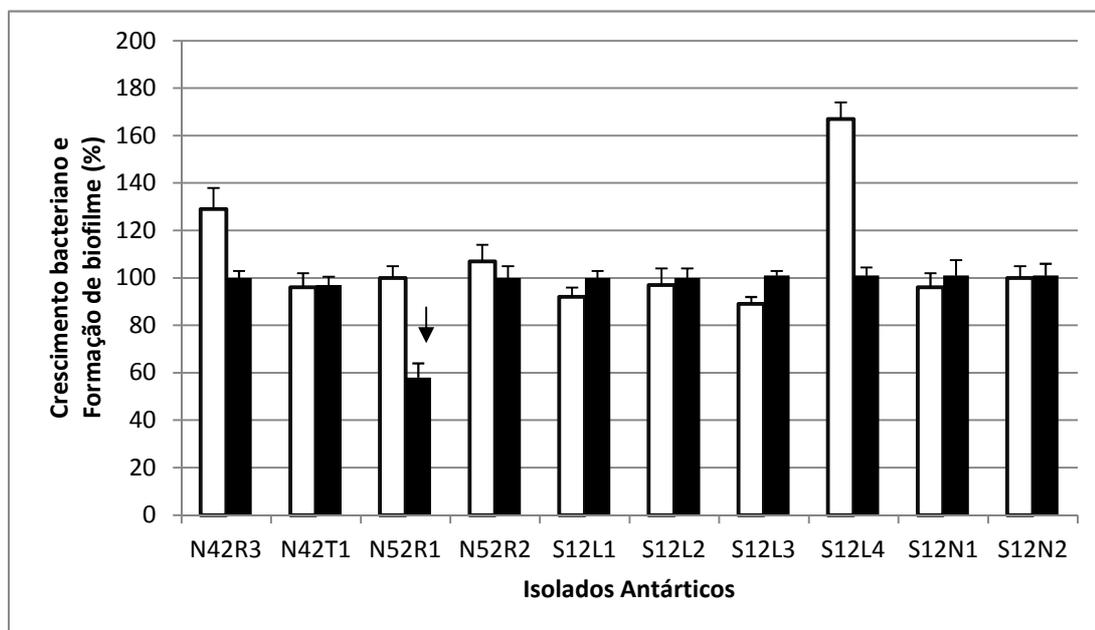


Figura 15: Crescimento bacteriano (barras brancas) e formação de biofilme (barras pretas) de *P. aeruginosa* perante filtrados dos isolados antárticos; o controle positivo equivale a 100% de crescimento e de formação de biofilme; as barras de erros representam o d.p. Seta aponta para isolado com atividade antibiofilme.

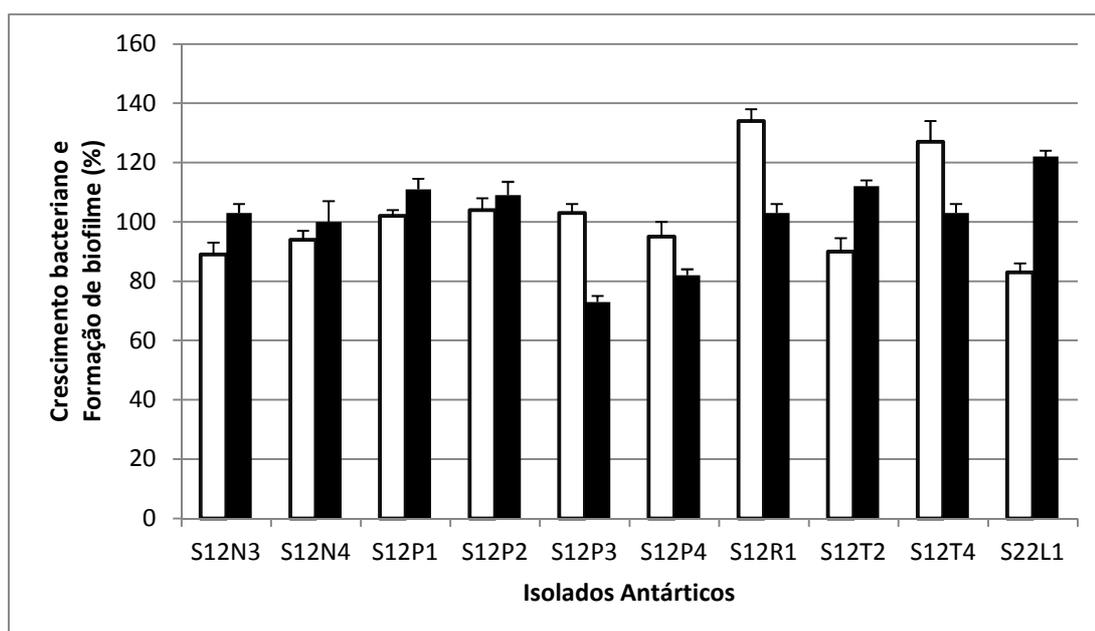


Figura 16: Crescimento bacteriano (barras brancas) e formação de biofilme (barras pretas) de *P. aeruginosa* perante filtrados dos isolados antárticos; o controle positivo equivale a 100% de crescimento e de formação de biofilme; as barras de erros representam o d.p.

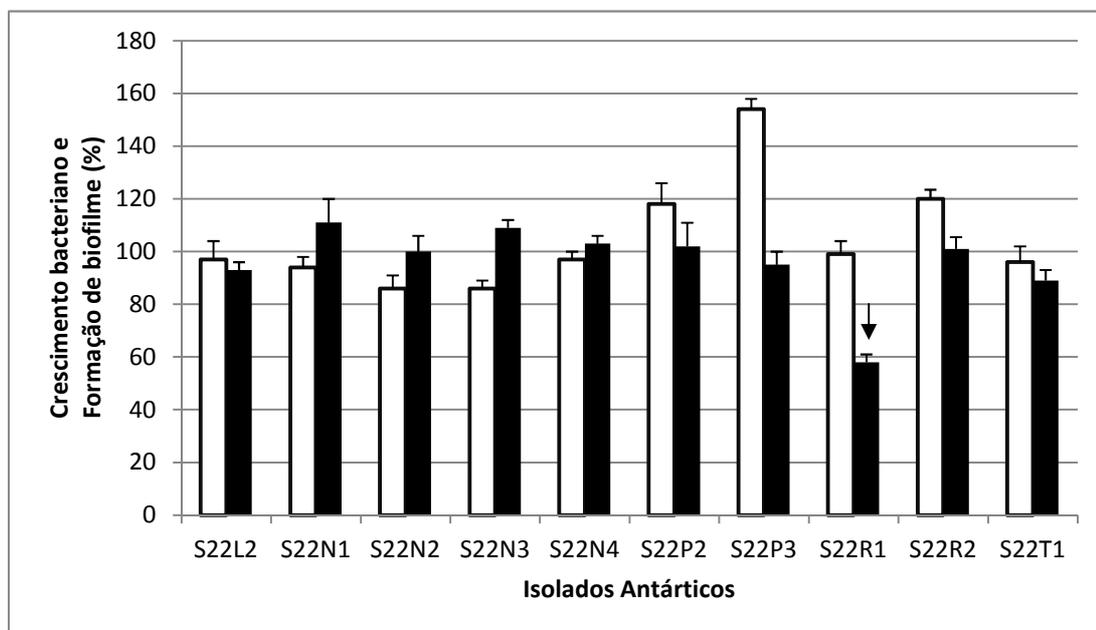


Figura 17: Crescimento bacteriano (barras brancas) e formação de biofilme (barras pretas) de *P. aeruginosa* perante filtrados dos isolados antárticos; o controle positivo equivale a 100% de crescimento e de formação de biofilme; as barras de erros representam o d.p. Seta aponta para isolado com atividade antibiofilme.

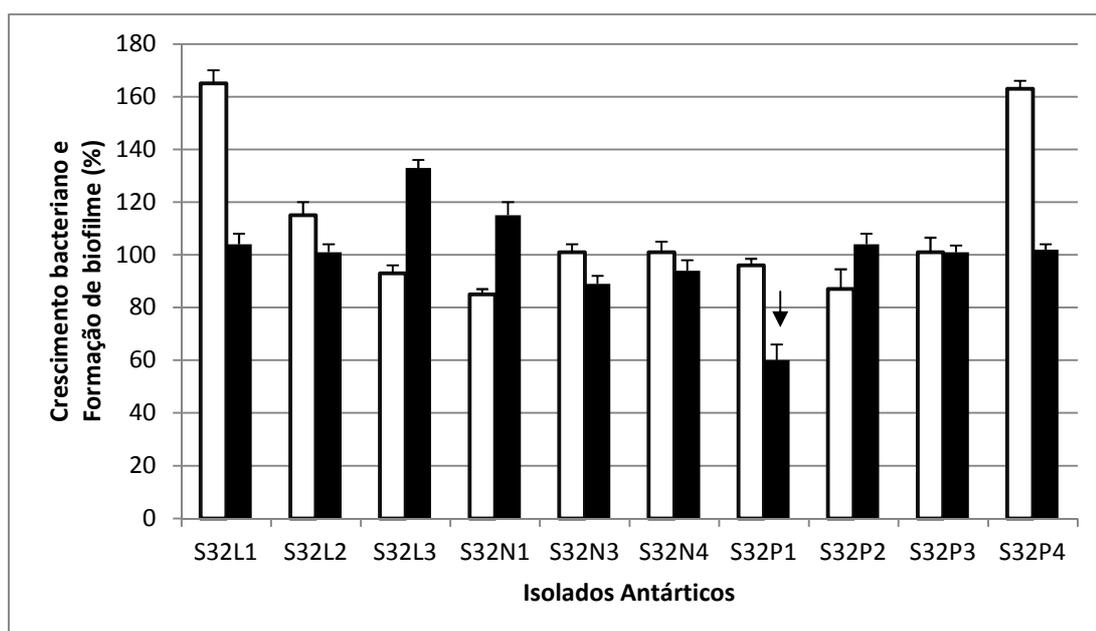


Figura 18: Crescimento bacteriano (barras brancas) e formação de biofilme (barras pretas) de *P. aeruginosa* perante filtrados dos isolados antárticos; o controle positivo equivale a 100% de crescimento e de formação de biofilme; as barras de erros representam o d.p. Seta aponta para isolado com atividade antibiofilme.

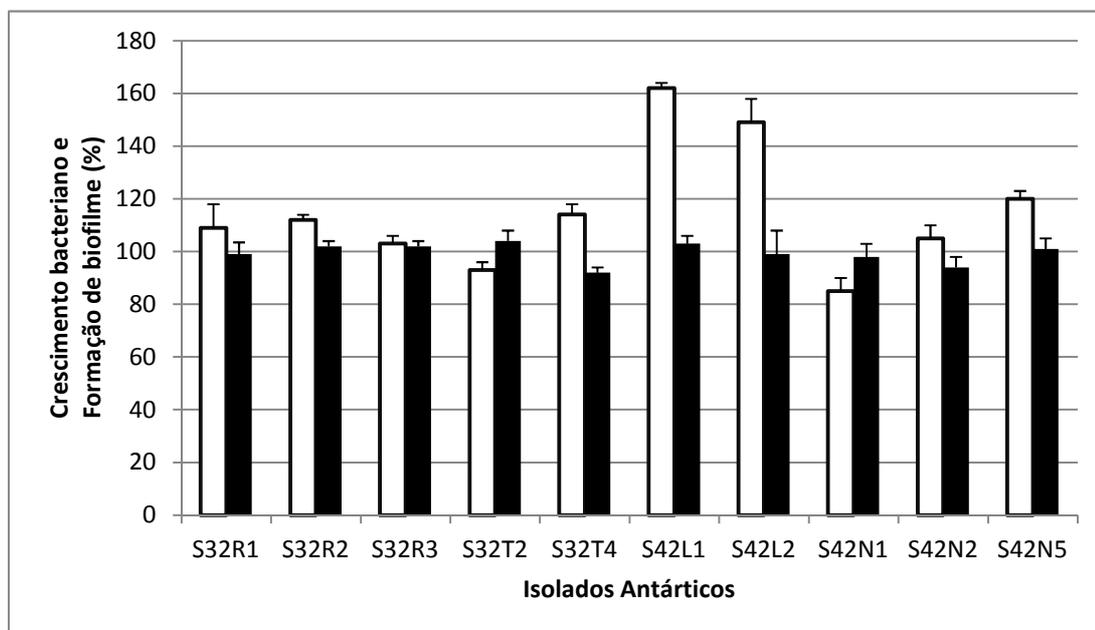


Figura 19: Crescimento bacteriano (barras brancas) e formação de biofilme (barras pretas) de *P. aeruginosa* perante filtrados dos isolados antárticos; o controle positivo equivale a 100% de crescimento e de formação de biofilme; as barras de erros representam o d.p.

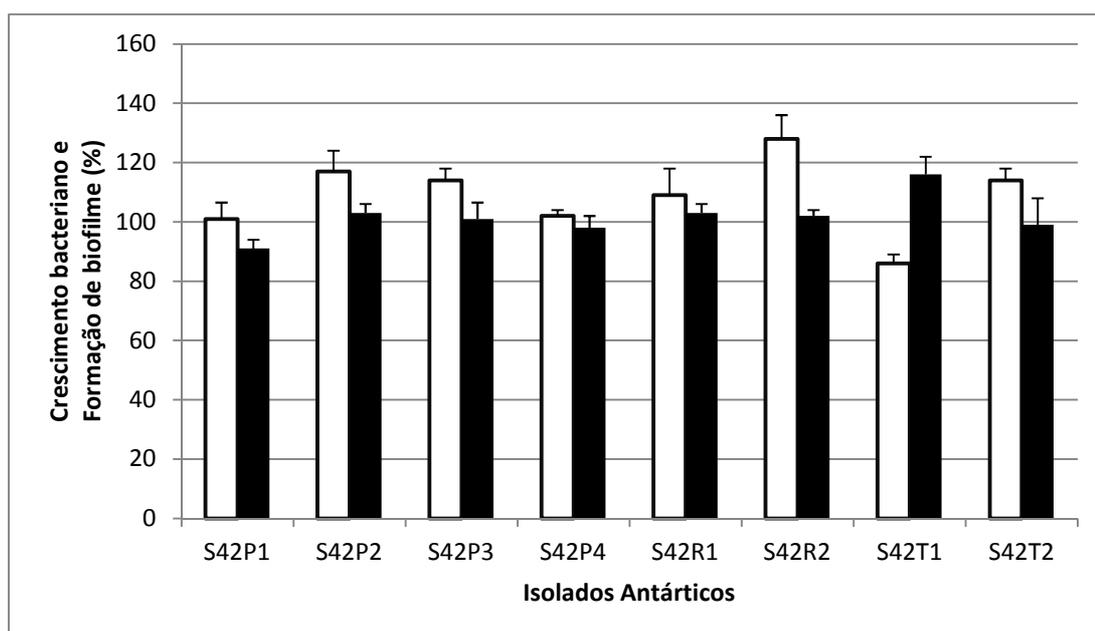


Figura 20: Crescimento bacteriano (barras brancas) e formação de biofilme (barras pretas) de *P. aeruginosa* perante filtrados dos isolados antárticos; o controle positivo equivale a 100% de crescimento e de formação de biofilme; as barras de erros representam o d.p.

#### 4. Conclusões e Perspectivas

Os resultados encontrados nesse estudo evidenciaram o grande potencial dos microrganismos do continente antártico em controlar o crescimento e formação de biofilmes patogênicos, visto que 73,5% dos filtrados testados apresentaram alguma bioatividade frente aos dois modelos estudados *S. epidermidis* e *P. aeruginosa*. Além disso, a maioria dos isolados antárticos mostraram ação contra *S. epidermidis* e apenas 5,1% das bactérias da Antártica foram ativas contra *P. aeruginosa*, demonstrando uma maior dificuldade na busca por moléculas ativas contra essa bactéria.

O isolado S22L2 (*Pseudomonas sp*) mostrou-se bastante promissor, graças a sua alta atividade antibiofilme e a não interferência no crescimento bacteriano. Por isso, o filtrado S22L2 foi testado contra isolados clínicos de cateter venoso central e sua ação foi visualizada por microscopia eletrônica de varredura. Em adição, o extrato do isolado S22L2 foi fracionado para elucidação de seus componentes e maior compreensão de sua atividade. As técnicas de extração em fase sólida e cromatografia em camada delgada descartaram a presença dos compostos terpenóides, fenilpropanóides, esteróides, saponinas, cumarinas e antraquinona. Por outro lado, as aminas, os aminoácidos e os polifenóis parecem ser o(s) responsável(is) pela bioatividade. Essas três classes de compostos vêm sendo relatadas como antibiofilme por diversos autores Zhang *et al.* (2010), Dean *et al.* (2011), Pettit *et al.* (2000), Cowan (1999), Cushnie & Lamb (2005), Tsuchiya *et al.* (1996), Jagtap & Karkera (2000), Marino *et al.* (2010) e Song *et al.* (2007).

Estudos químicos mais avançados de isolamento e purificação são necessários para identificar os principais componentes funcionais do extrato S22L2, assim como uma melhor caracterização do mecanismo de ação do mesmo. As perspectivas desse trabalho são:

- (1) Purificação dos outros extratos com maiores atividades e o sequenciamento da região 16S rRNA desses isolados antárticos ativos.
- (2) Testes de citotoxicidade serão necessários para aplicação clínica dessas moléculas.
- (3) Ensaios de impregnação desses compostos ativos em dispositivos médicos.

## 5. Anexos

### **Normas para correção do Trabalho de Conclusão de Curso de Biomedicina.**

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE  
COMISSÃO DE GRADUAÇÃO  
BIOMEDICINA

#### **Orientações aos componentes das Bancas Examinadoras**

Solicitamos aos Examinadores que analisem as monografias em relação à sua qualidade científica e metodológica, clareza da apresentação e adequação da Discussão em relação aos resultados obtidos. É importante, também, observar se a seção da monografia referente ao artigo científico está em conformidade com às normas do periódico científico escolhido pelo aluno e orientador. Cabe lembrar que o nível de exigência deve ser adequado a um trabalho de conclusão de curso de graduação e não de um de pós-graduação.

Adicionalmente, devem ser levadas em consideração as normas estabelecidas pela Comissão de Graduação para a redação da monografia. A Comissão de Graduação do Curso de Biomedicina agradece a participação dos Examinadores nesta atividade tão importante do curso, encorajando-os a estarem presentes no dia da apresentação; contudo, a presença não será de caráter obrigatório. Solicitamos que cada membro da Banca Examinadora emita um parecer acompanhado de um conceito (A, B, C ou D), conforme os padrões da UFRGS, e o envie ao orientador do aluno até, no máximo, um dia após a apresentação oral.

Atenciosamente,

Comissão de Graduação do Curso de Biomedicina

Rua Sarmiento Leite, 500 – 1º andar – Sala 151  
Campus Centro – 90050-170 – Porto Alegre – RS.  
biomedicina@ufrgs.br  
Fone/Fax: (51) 3316.3155

**Normas para apresentação oral e escrita do trabalho experimental do estágio em pesquisa e monografia**

1. O trabalho experimental do aluno, realizado obrigatoriamente durante a atividade Estágio em Pesquisa e Monografia, deverá ser apresentado na forma escrita e oral ao final dos seis meses da atividade.

2. Aquele aluno que optar por realizar o Estágio Curricular Supervisionado em Biomedicina em atividade de pesquisa, sob a orientação do mesmo Professor/Pesquisador e na mesma linha de pesquisa do Estágio em Pesquisa e Monografia, poderá apresentar o seu trabalho ao final dos seis meses deste segundo estágio.

Do trabalho escrito:

1. O trabalho escrito deverá ser organizado da seguinte forma:
  - a. Folha de rosto com título, nome do aluno, nome do orientador, nome do co-orientador quando existente, curso e ano;
  - b. Agradecimentos e dedicatória (quando existentes);
  - c. Índice geral;
  - d. Resumo;
  - e. Introdução compreensiva;
  - f. Trabalho experimental na forma de artigo científico, seguindo a formatação exigida pelo periódico onde seria submetido, ainda que os resultados obtidos sejam apenas preliminares;
  - g. Conclusões e Perspectivas;
  - h. Bibliografia adicional que não esteja presente no artigo científico;
  - i. Anexos.
2. O aluno poderá optar por escrever o artigo científico, referido no item f acima, na língua inglesa.
3. O trabalho deverá ser impresso em folha A4, com tipo de letra tamanho 12, páginas numeradas a partir da folha de rosto e respeitando as seguintes margens:
  - a. Margem esquerda: 4,0 cm;
  - b. Margem direita: 2,5 cm;
  - c. Margem superior: 2,5 cm;
  - d. Margem inferior: 2,5 cm.
4. O aluno deverá entregar uma cópia impressa do trabalho escrito para cada membro da Banca Examinadora pelo menos 15 dias antes da apresentação oral.
5. O aluno deverá entregar à Comissão de Graduação uma cópia impressa e uma na forma eletrônica, em CD, do trabalho escrito, após terem sido efetuadas as correções solicitadas pela Banca Examinadora.

Da apresentação oral:

1. O aluno deverá apresentar oralmente o seu trabalho no dia e horário determinados pela Comissão de Graduação para este fim.
2. Será alocado a cada aluno 20 minutos para a apresentação oral e 10 minutos adicionais para arguição dos membros da Banca Examinadora.

Da Banca Examinadora:

1. A Banca Examinadora será constituída de dois professores, pesquisadores ou doutorandos indicados pelo orientador do aluno.
2. Não será exigida a presença dos integrantes da Banca Examinadora no dia da apresentação oral.

Do conceito final:

1. O conceito final do aluno será calculado a partir dos conceitos emitidos pelos integrantes da Banca Examinadora e do orientador do aluno.
2. O orientador também deverá emitir um conceito pelo Estágio de Pesquisa

## 6. Bibliografia

<sup>1</sup>HALL-STOODLEY, L.; COSTERTON, J.W.; STOODLEY, P. Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. **Nature Reviews Microbiology**, v. 2, p. 95-108, 2004.

<sup>2</sup>COSTERTON, J.W.; GEESEY, G.G.; CHENG, K.J. How bacteria stick. **Scientific American**, v. 238, p.86-95, 1978.

<sup>3</sup>BATTIN, T.J.; SLOAN, W.T.; KJELLEBERG, S.; DAIMS, H.; HEAD, I.M.; CURTIS, T.P.; EBERL, L. Microbial landscapes: new paths to biofilm research. **Nature Reviews Microbiology**, v. 5, p. 76-81, 2007.

<sup>4</sup>MACEDO, A.J.; ABRAHAM, W.R. Can infections biofilm be controlled by blocking bacterial communication? **Medicinal Chemistry**, v. 5, p. 517-528, 2009.

<sup>5</sup>PAN, J.; REN, D. Quorum sensing inhibitors: a patent overview. **Expert Opinion on Therapeutic Patents**, v. 19, p. 1581-1601, 2009.

<sup>6</sup>HENSE, B.A.; KUTTLER, C.; MULLER, J.; ROTHBAILER, M.; HARTMANN, A.; KREFT, J.U. Does efficiency sensing unify diffusion and quorum sensing? **Nature Reviews Microbiology** v. 5, p. 230-239, 2007.

<sup>7</sup>RYAN, R.P.; DOW, J.M. Diffusible signals and interspecies communication in bacteria. **Microbiology**. v. 154, p. 1845-1854, 2008.

<sup>8</sup>FLEMMING, H.C.; WINGENDER, J. The biofilm matrix. **Nature Reviews Microbiology**. v. 8, p. 623-633, 2010.

<sup>9</sup>STEWART, P.S.; FRANKLIN, M.J. Physiological heterogeneity in biofilms. **Nature Reviews Microbiology** v. 3, p. 199-210, 2008.

<sup>10</sup>DAVIES, D. Understanding biofilm resistance to antimicrobial agents. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 2, p. 114-122, 2003.

<sup>11</sup>HARRISON, J.J.; CERI, H.; TURNER, R.J. Multimetal resistance and tolerance in microbial biofilms. **Nature Reviews Microbiology**, v. 12, p. 928-938, 2007.

<sup>12</sup>LEONE, M.; DILLON, L.R. Catheter outcomes in home infections. **Journal of Infusion Nursing**, v. 31, p. 84-91, 2008.

<sup>13</sup>TENOVER, F.C. Mechanisms of antimicrobial resistance in bacteria. **The American Journal of Medicine**, v.119, p.3-10, 2006.

<sup>14</sup>DONELLI, G.; FRANCOLINI, I.; ROMOLI, D.; GUAGLIANONE, E.; PIOZZI, A.; RAGUNATH, C.; KAPLAN, J.B. Synergistic activity of dispersin B and cefamandole nafate in inhibition of staphylococcal biofilm growth on polyurethanes. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 8, p. 2733-2740, 2007.

- <sup>15</sup>STAR, L.; KUPFERBERG, E.D. The misuse of antibiotics. *Medical Ethics* (Burlingt Mass). v. 1, p. 5-8, 2004.
- <sup>16</sup>JANSEN, B.; PETERS, G.; PULVERER, G. Mechanisms and clinical relevance of bacterial adhesion to polymers. **Journal of Biomaterials Applications**, v. 2, p. 520-543, 1988.
- <sup>17</sup>MURGA, R.; MILLER, J.M.; DONLAN, R.M. Biofilm formation by gram-negative bacteria on central venous catheter connectors: effect of conditioning films in a laboratory model. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, p. 2294-2297, 2001.
- <sup>18</sup>KOKAI-KUN, J.F.; CHANTURIYA, T.; MOND, J.J. Lysostaphin eradicates established *Staphylococcus aureus* biofilms in jugular vein catheterized mice. **Journal of Antimicrobial and Chemotherapy**, v. 64, p. 94-100, 2009.
- <sup>19</sup>BOLES, B.R.; HORSWILL, A.R. Agr-mediated dispersal of *Staphylococcus aureus* biofilms. **PLoS Pathogens**, v. 4, n.e1000052, 2008.
- <sup>20</sup>LANDINI, P.; ANTONIANI, D.; BURGESS, J.G.; NIJLAND, R. Molecular mechanisms of compounds affecting bacterial biofilm formation and dispersal. **Applied Microbiology and Biotechnology**. v. 3, p. 813-823, 2010.
- <sup>21</sup>BANNERMAN, T.L.; PEACOCK, S.J. *Staphylococcus, Micrococcus*, and other catalase-positive cocci. In: MURRAY, P.R.; BARON, E.J.; JORGENSEN, J.H.; LANDRY, M.L.; PFALLER, M.A. **Manual of clinical microbiology**. 9. ed. Washington: ASM Press, 2007. v. 1. p.390-411
- <sup>22</sup>OTTO, M. *Staphylococcus epidermidis* - the 'accidental' pathogen. **Nature Reviews Microbiology**, v. 7, p. 555-567, 2009.
- <sup>23</sup>MACK, D.; ROHDE, H.; HARRIS, L.G.; DAVIES, A.P.; HORSTKOTTE, M.A.; KNOBLOCH, J.K. Biofilm formation in medical device-related infection. *The International Journal of Artificial Organs*, v. 29, p. 343-359, 2006.
- <sup>24</sup>BLONDEL-HILL, E.; HENRY, D.A.; SPEERT, D.P. *Pseudomonas*. In: MURRAY, P.R.; BARON, E.J.; JORGENSEN, J.H.; LANDRY, M.L.; PFALLER, M.A. **Manual of clinical microbiology**. 9. ed. Washington: ASM Press, 2007. v.1. p.734-748.
- <sup>25</sup>RATJEN, F.; DORING, G. Cystic fibrosis. **The Lancet**, v. 361, p. 681-689, 2003.
- <sup>26</sup>HARMSSEN, M.; YANG, L.; PAMP, S.J.; TOLKER-NIELSEN, T. An update on *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation, tolerance, and dispersal. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**. v. 3, p. 253-268, 2010.
- <sup>27</sup>RAMSEY, D.M.; WOZNIAK, D.J. Understanding the control of *Pseudomonas aeruginosa* alginate synthesis and the prospects for management of chronic infections in cystic fibrosis. **Molecular Microbiology**, v. 56, p. 309-322, 2005.

<sup>28</sup>BLOCK, W.; LEWIS SMITH, R.I.; KENNEDY, A.D. Strategies of survival and resource exploitation in the Antarctic fellfield ecosystem. **Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society**, v. 3, p. 449-484, 2009.

<sup>29</sup>MOJIB, N.; PHILPOTT, R.; HUANG, J.P.; NIEDERWEIS, M.; BEJ, A.K. Antimycobacterial activity in vitro of pigments isolated from Antarctic bacteria. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v. 4, p. 531-540, 2010.

<sup>30</sup>PRISCU, J.C.; FRITSEN, C.H.; ADAMS, E.E.; GIOVANNONI, S.J.; PAERL, H.W.; MCKAY, C.P.; DORAN, P.T.; GORDON, D.A.; LANOIL, B.D.; PINCKNEY, J.L. Perennial Antarctic lake ice: an oasis for life in a polar desert. **Science**, v. 5372, p. 2095-2098, 1998.

<sup>31</sup>CARY, S.C.; MCDONALD, I.R.; BARRETT, J.E.; COWAN, D.A. On the rocks: the microbiology of Antarctic Dry Valley soils. **Nature Reviews Microbiology**, v. 2, p. 129-138, 2010.

<sup>32</sup>TEIXEIRA, L.C.; PEIXOTO, R.S.; CURY, J.C.; SUL, W.J.; PELLIZARI, V.H.; TIEDJE, J.; ROSADO, A.S. Bacterial diversity in rhizosphere soil from Antarctic vascular plants of Admiralty Bay, maritime Antarctica. **ISME**, v. 8, p. 989-1001, 2010.

<sup>33</sup>DOS SANTOS, I.R.; SILVA-FILHO, E.V.; SCHAEFER, C.; MARIA SELLA, S.; SILVA, C.A.; GOMES, V.; PASSOS, M.J.; VAN NGAN, P. Baseline mercury and zinc concentrations in terrestrial and coastal organisms of Admiralty Bay, Antarctica. **Environ Pollut.** v. 2, p. 304-311, 2006.

<sup>34</sup>MARTINS, C.C.; BÍCEGO, M.C.; ROSE, N.L.; TANIGUCHI, S.; LOURENÇO, R.A.; FIGUEIRA, R.C.; MAHIQUES, M.M.; MONTONE, R.C. Historical record of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and spheroidal carbonaceous particles (SCPs) in marine sediment cores from Admiralty Bay, King George Island, Antarctica. **Environ Pollut.** v. 1, p. 192-200, 2010.

<sup>35</sup>RAKUSA-SUSZCZEWSKI, S.; JANECKI, T.; DOMANOV, M.M. Starvation and chemoreception in Antarctic benthic invertebrates. **Izv Akad Nauk Ser Biol.** v. 1, p. 68-75, 2010.

<sup>36</sup>MONTONE, R.C.; TANIGUCHI, S.; SERICANO, J.; WEBER, R.R.; LARA, W.H. Determination of polychlorinated biphenyls in Antarctic macroalgae *Desmarestia* sp. **Sci Total Environ.** v. 1-3, p. 181-186, 2001.

<sup>37</sup>COCKELL, C.S.; RETTBERG, P.; HORNECK, G.; WYNN-WILLIAMS, D.D.; SCHERER, K.; GUGG-HELMINGER, A. Influence of ice and snow covers on the UV exposure of terrestrial microbial communities: dosimetric studies. **J Photochem Photobiol B.** v. 1, p. 23-32, 2002.

<sup>38</sup>POINTING, S.B.; CHAN, Y.; LACAP, D.C.; LAU, M.C.; JURGENS, J.A.; FARRELL, R.L. Highly specialized microbial diversity in hyper-arid polar desert. **Proc Natl Acad Sci U S A.** v. 47, p. 19964-19969, 2009.

<sup>39</sup>LO GIUDICE, A.; BRILLI, M.; BRUNI, V.; DE DOMENICO, M.; FANI, R.; MICHAUD, L. Bacterium-bacterium inhibitory interactions among psychrotrophic bacteria isolated from Antarctic seawater (Terra Nova Bay, Ross Sea). **FEMS Microbiol Ecol.** v. 3, p. 383-396, 2007.

<sup>40</sup>O'BRIEN, A.; SHARP, R.; RUSSELL, N.J.; ROLLER, S. Antarctic bacteria inhibit growth of food-borne microorganisms at low temperatures. **FEMS Microbiol Ecol.** v. 2, p. 157-167, 2004.