

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

FACULDADE DE FARMÁCIA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**Bactéria associada à esponja marinha como fonte de metabólitos bioativos:
atividade antibiofilme e antimicrobiana**

DANIELLE DA SILVA TRENTIN

PORTO ALEGRE, 2009

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

FACULDADE DE FARMÁCIA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**Bactéria associada à esponja marinha como fonte de metabólitos bioativos:
atividade antibiofilme e antimicrobiana.**

Dissertação apresentada por **Danielle da Silva Trentin**
para obtenção do GRAU DE MESTRE em Ciências
Farmacêuticas

Orientador: Prof. Dr. Alexandre José Macedo

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, em nível de Mestrado da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e aprovada em 30.10.2009, pela Banca Examinadora constituída por:

Prof. Dr. Afonso Luís Barth
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Prof. Dr. Hugo Verli
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Profa. Dr. Marilene Henning Vainstein
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

T795b Trentin, Danielle da Silva

Bactéria associada à esponja marinha como fonte de metabólitos bioativos: atividade antibiofilme e antimicrobiana / Danielle da Silva Trentin. – Porto Alegre: UFRGS, 2009. – xxvi, 92 p. : il.

Dissertação (mestrado). UFRGS. Faculdade de Farmácia. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas.

1. Esponjas marinhas. 2. Bactérias. 3. Staphylococcus epidermidis. 4. Chromobacterium violaceum. 5. Compostos bioativos. 6. Ácido pimélico. 7. Atividade antibiofilme. 8. Atividade antimicrobiana. I. Macedo, Alexandre José. II. Título.

CDU: 616-093:593.4

Bibliotecária responsável:
Margarida Maria Cordeiro Fonseca Ferreira – CRB 10/480

Agradecimentos ao CNPq, órgão que financiou a bolsa de estudos para o desenvolvimento deste trabalho, e ao Laboratório de Peptidases do Centro de Biotecnologia desta Universidade que disponibilizou todos os equipamentos e materiais necessários para a realização dos experimentos práticos na elaboração da presente dissertação

DEDICATÓRIA:

Aos meus pais e meus avós, vocês são o meu porto seguro.

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Dr. Alexandre José Macedo, pela oportunidade de realizar o mestrado, desejo que sempre possui desde que decidi cursar a faculdade de Farmácia. Muito obrigada pelos exemplos de ser humano e profissional, de amigo e de chefe, obrigada pelo suporte, doação, incentivo diário e dedicação. Obrigada pela confiança que depositas em mim e pela orientação clara e tranqüila.

Ao Professor Dr. Carlos Termignoni, por disponibilizar o Laboratório de Peptidases do Centro de Biotecnologia da UFRGS para desenvolver este trabalho.

À Ana Lúcia Souza Antunes, por ter me dado a oportunidade de conhecer o Prof. Alexandre, pelos momentos únicos de alegria e descontração, pela força nas angústias, pelo incentivo de buscar o conhecimento e pela grande amizade. Obrigada pela contribuição nos experimentos com isolados clínicos deste trabalho.

À Andréia Estrela e ao Wolf-Rainer Abraham pela ajuda nos experimentos de HPLC-MS-MS e pelo suporte técnico.

Ao pessoal do laboratório 217 do Centro de Biotecnologia da UFRGS, em especial à Dani Arruda, Karine Zimmer e Marina Scopel pela ajuda diária no laboratório, pelos momentos de estudo e de diversão, pela companhia, pelos risos, pelo suporte e pela amizade que conquistamos. Obrigada por sonharem comigo e por estarem presente neste momento tão especial. À Dani Gorziza, pela ajuda e pelas contribuições neste trabalho, obrigada pelo carinho. À Adri Seixas pela calma, firmeza e carisma que transmites, obrigada pela tentativa nos experimentos com busca de enzimas. Ao Matheus, Carlos, Filipe, Fernando, Luana e Lucas, pela convivência no laboratório e pela ajuda sempre que necessária.

Aos meus pais, Jorge e Eliane, meus avós Luiz e Dulce e à minha dinda, Tuti, pelos exemplos de doçura e firmeza, de perseverança e disciplina, por todo esforço e

pela educação recebida. Obrigada pela preocupação, pela paciência, pela presença, pelo carinho e pelo apoio.

Aos meus irmãos, Rô e Rafa, e à minha afilhada, Nick, pela alegria de viver, pelas risadas, pelas trocas e pelo convívio.

Ao Gui, que acompanhou o fim deste trabalho, mas que me passou o apoio e a calma necessária para completar esta conquista. Obrigada pelo companheirismo, pelo incentivo constante, por acreditar nos meus sonhos e por estar ao meu lado neste momento tão importante.

Às minhas amigas de Porto Alegre Adri, Bi e Manu, e às de Pelotas, Popô, Lalá, Gabi Osório, Maíra, Gabi Giusti, Lú, Bitá e Cissa que sempre incentivaram e estimularam meus estudos, valeu pela força!

EPÍGRAFE:

O degrau da escada não foi inventado para repousar,
mas apenas para sustentar o pé o tempo necessário para que
o homem coloque o outro pé um pouco mais alto.

Aldous Huxley

RESUMO

Segundo dados da Organização Mundial da Saúde (OMS), as doenças infecciosas causam 25 % das mortes em todo o mundo e 45 % nos países menos desenvolvidos. A formação de biofilmes bacterianos possui um papel importante na patogênese, sendo causa comum de infecções persistentes. Uma vez estabelecido o biofilme, as opções terapêuticas tornam-se limitadas devido à difícil perfusão de agentes antimicrobianos no biofilme, e ao estado de latência de algumas células bacterianas que não são atingidas pelos antimicrobianos e permanecem como um foco de re-infecção. A busca de princípios ativos a partir de microrganismos é uma das áreas em que mais se investe nos países desenvolvidos, principalmente nas pesquisas de bioprospecção realizadas pelas indústrias farmacêuticas. Este trabalho objetivou obter metabólitos com atividades biológicas, especialmente atividade antibiofilme e antimicrobiana, provenientes de bactérias associadas a esponjas marinhas. Foram coletadas 39 esponjas marinhas das quais se isolaram 160 bactérias associadas. Lotes de 21 bactérias foram selecionados para a fase de cultivo e produção de metabólitos. Basicamente utilizou-se o método do cristal violeta e microscopia eletrônica de varredura (MEV) para avaliar a atividade antibiofilme e a atividade antimicrobiana foi avaliada pelo método dos cilindros e pelo monitoramento do crescimento bacteriano através da densidade óptica. O filtrado 224 produzido por um cocobacilo associado à esponja *Darwinella* sp. foi capaz de inibir em $88,3 \pm 9,6$ % ($p < 0.001$) e $30,3 \pm 14,4$ % ($p < 0.05$) a formação de biofilme de *Staphylococcus epidermidis* ATCC35984 e de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC27853, respectivamente, sem apresentar atividade antimicrobiana a estes microrganismos. Imagens de MEV confirmam a atividade antibiofilme e mostram a ausência de matriz protetora nos biofilmes tratados, indicando que o filtrado atua impedindo a produção da matriz exopolissacarídica. Frente a treze *S. epidermidis* isolados de cateter venoso central em 2008 no Hospital de Clínicas de Porto Alegre, dez amostras apresentaram redução na formação de biofilme ($p < 0.05$). Adicionalmente, uma fração obtida a partir do filtrado 224 apresentou atividade antimicrobiana contra *Chromobacterium violaceum* DSM 30191. Análises de HPLC MS-MS e infravermelho indicam a presença do ácido pimélico na amostra. Experimentos visando avaliar se o ácido pimélico é realmente o composto responsável pela atividade antimicrobiana contra *C. violaceum* estão sendo elaborados. A atividade antibiofilme encontrada pelo filtrado 224 representa um exemplo do conceito mais inovador de terapia antimicrobiana – as moléculas antivirulência – e poderá contribuir no tratamento de infecções relacionadas com a formação de biofilmes, principalmente as que envolvem o uso de biomateriais.

Palavras-chaves: Bactéria associada à esponja marinha; *Darwinella* sp., *Staphylococcus epidermidis*, *Chromobacterium violaceum*, compostos bioativos, ácido pimélico, atividade antibiofilme, atividade antimicrobiana.

ABSTRACT

According World Health Organization (WHO) data, infectious diseases cause 25 % of deaths around the world and 45 % in less developed countries. The formation of bacterial biofilms has an important role in pathogenesis been a common cause of persistent infections. Once established biofilm, treatment options become limited because of difficult infusion of antimicrobial agents into biofilms, and the latent state of some bacterial cells that are not affected by antimicrobials and will remain as a focus of re-infection. The search of active molecules from microorganisms is one of the areas in which more is invested in developed countries, especially in bioprospecting research conducted by pharmaceutical companies. This study aimed to obtain metabolites with biological activities, especially antibiofilm and antimicrobial activity, from bacteria associated to marine sponges. We collected 39 marine sponges of which 160 bacteria associated were isolated. Lots of 21 bacteria were selected for the culture phase and metabolites production. Basically we used the method of crystal violet and scanning electron microscopy (SEM) to evaluate the antibiofilm activity and the antimicrobial activity was evaluated by the method of cylinders and bacterial growth by optical density. The filtrate produced by coccobacilli called 224 associated with *Darwinella* sp. sponge was able to inhibit to 88.3 ± 9.6 % ($p < 0.001$) and 30.0 ± 14.4 % ($p < 0.05$) biofilm formation of *Staphylococcus epidermidis* ATCC35984 and *Pseudomonas aeruginosa* ATCC27853, respectively, without showing antimicrobial activity against these microorganisms. SEM images confirm the antibiofilm activity and show the absence of protective matrix in treated biofilms, indicating that the filtrate acts by preventing the production of exopolysaccharide matrix. Considering thirteen *S. epidermidis* isolates from central venous catheter in 2008 at the Hospital de Clínicas de Porto Alegre, ten samples showed reduction in biofilm formation ($p < 0.05$). Additionally, a fraction obtained from the filtrate 224 presented antimicrobial activity against *Chromobacterium violaceum* DSM 30191. Analysis of HPLC-MS-MS and infrared indicate the presence of pimelic acid in the sample. Experiments to evaluate if the pimelic acid is actually the compound responsible for antimicrobial activity against *C. violaceum* are being prepared. The antibiofilm activity found by the 224 filtrate is an example of the most innovative concept of antibacterial therapy - the antivirulence molecules - and may help in the treatment of infections related to the biofilm formation, especially those involving the use of biomaterials.

Key-words: Marine sponge bacterium-associated, *Darwinella* sp., *Staphylococcus epidermidis*, *Chromobacterium violaceum*, bioactive compounds, pimelic acid, antibiofilm activity, antimicrobial activity.

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

1. INTRODUÇÃO

Figura 1.1 Número de produtos naturais marinhos descritos no período de 1965 a 2007.....	2
Figura 1.2: Número de artigos publicados por ano com a palavra-chave “Marine natural products”.....	3
Figura 1.3: Desenho esquemático da estrutura de uma esponja marinha.....	4
Figura 1.4: Número de compostos descritos no período de 1965 a 2007 a partir de diferentes fontes marinhas.....	5
Figura 1.5: Número de artigos publicados desde 1960 e respectivos países de origem com a palavra-chave “Marine natural products”.....	6
Figura 1.6: Estágios do desenvolvimento dos biofilmes.....	8
Figura 1.7: Principais moléculas autoindutoras usadas na sinalização bacteriana.....	9
Figura 1.8: Sistema <i>quorum sensing</i> em bactéria Gram-positiva e em bactéria Gram-negativa.....	11
Figura 1.9: Atividade metabólica em uma microcolônia de biofilme.....	12
Figura 1.10: Principais alvos para combate aos biofilmes microbianos.....	15
Figura 1.11: Produção de alginato por <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	21
Tabela 1.1: Compostos inibidores do sistema <i>Quorum sensing</i> produzidos por eucariotos.	16

3.1 CAPÍTULO 1:

Figura 3.1.1: Crescimento em meio sólido de microrganismos associados à esponja marinha.....	31
Figura 3.1.2: Rastreamento de atividade antibiofilme já formado de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC27853.....	36
Figura 3.1.3: Rastreamento de atividade antibiofilme já formado de <i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC35984.....	36

Figura 3.1.4 Rastreamento de atividade antiformação de biofilme de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC27853.....	37
Figura 3.1.5: Rastreamento de atividade antiformação de biofilme de <i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC35984.....	37
Figura 3.1.6: Influência da quantidade de inóculo de <i>Staphylococcus epidermidis</i> na atividade antiformação de biofilme do filtrado 224.....	38
Figura 3.1.7: Influência do tempo de cultivo da bactéria 224 na produção de metabólito(s) capaz(es) de inibir a formação de biofilme de <i>Staphylococcus epidermidis</i>	39
Tabela 3.1.1: Composição dos meios de cultura sólidos para isolamento bacteriano das esponjas marinhas.....	32

3.2 CAPÍTULO 2:

Figure 3.2.1: SEM of the <i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 35984 biofilms.....	51
Figure 3.2.2: Antibiofilm formation activity of 224F against <i>Staphylococcus epidermidis</i> isolated from CVC	52
Table 3.2.1: Susceptibility profile of clinical isolates to antimicrobials and degrees of inhibition of biofilm formation by 224F	53

3.3 CAPÍTULO 3:

Figure 3.3.1: Inibição da produção de violaceína pelo <i>Chromobacterium violaceum</i> DSM 30191.....	61
Figura 3.3.2: Ensaio de atividade antimicrobiana pela avaliação do crescimento bacteriano em OD ₆₀₀ frente ao <i>Chromobacterium violaceum</i> DSM 30191.....	62
Figura 3.3.3: Ensaio de atividade antimicrobiana através da avaliação pelo crescimento bacteriano em OD ₆₀₀ frente ao <i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 35984 e à <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC27984.....	62
Figura 3.3.4: Cromatograma da fração água de diálise.....	63
Figura 3.3.5: Espectro HPLC-MS-MS do pico majoritário, mostrando ionizações no modo positivo.....	64
Figura 3.3.6: Espectro HPLC-MS-MS do pico majoritário, mostrando ionizações no modo negativo.....	64

Figura 3.3.7: Espectro de fragmentação do pico 273 majoritário do modo negativo.....	65
Figura 3.3.8: Estrutura do ácido pimélico.....	65
Figura 3.3.9: Espectro de infravermelho da fração água de diálise.....	66
Figura 3.3.10: Estrutura da biotina.....	67

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO GERAL.....	1
1.1 Esponjas marinhas e microrganismos associados.....	2
1.2 Biofilmes microbianos.....	7
1.3 Estratégias de combate aos biofilmes microbianos.....	13
1.4 <i>Staphylococcus epidermidis</i>	17
1.5. <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	19
1.6. <i>Chromobacterium violaceum</i>	22
2. OBJETIVOS.....	25
2.1 Objetivo geral.....	26
2.2 Objetivos específicos.....	26
3. CAPÍTULOS.....	27
3.1.: Capítulo 1: Rastreamento de metabólitos com atividade antibiofilme e antimicrobiana produzidos por bactérias associadas a esponjas marinhas.....	29
3.1.1 Introdução.....	30
3.1.2 Materiais e métodos.....	31
3.1.2.1 Coleta das esponjas marinhas e isolamento bacteriano.....	31
3.1.2.2 Produção de metabólitos.....	33
3.1.2. 3 Ensaio de bioatividade e microrganismos modelo.....	33
3.1.3 Resultados e discussão.....	35
3.1.3.1 Isolamento das bactérias marinhas.....	35

3.1.3.2 Rastreamento da atividade antibiofilme.....	35
3.1.3.3 Otimização da de alguns parâmetros da atividade antibiofilme do filtrado escolhido.....	38
3.1.3.4 Atividade antimicrobiana.....	39
3.2.: Capítulo 2: Artigo científico submetido: Marine bacterium metabolites inhibit biofilm formation of <i>Staphylococcus epidermidis</i> strains susceptible to specific antimicrobials	41
Abstract	42
Introduction	43
Materials and methods	45
Marine sponge collection and bacterial isolation.....	45
Bacterial strains and culture conditions.....	45
Production of bioactive metabolites.....	46
Antibiofilm assay.....	46
Antimicrobial assay.....	47
Detection of QSI using bacterial biosensor.....	48
Scanning electron microscopy (SEM)	49
Statistic analysis.....	49
Results	49
Production of the metabolite(s) and antibiofilm assays.....	49
Antibiofilm formation activity upon CVC clinical isolates.....	50
Searching a QSI molecule using bacterial biosensor.	53
Discussion	54
3.3.: Capítulo 3: Estudo da atividade antimicrobiana	57

3.3.1 Introdução	58
3.3.2 Materiais e métodos	58
3.3.2.1 Preparação do filtrado 224.....	58
3.3.2.2 Rastreamento de moléculas tipo AHL.....	59
3.3.2.3 Avaliação da atividade antibiofilme.....	59
3.3.2.4 Avaliação da atividade antimicrobiana.....	59
3.3.2.5 Análise cromatográfica por HPLC-MS-MS.....	59
3.3.2.6 Análise espectrofotométrica por infravermelho.....	60
3.3.3 Resultados e discussão	60
3.3.3.1 Rastreamento de moléculas tipo AHL e atividade antibiofilme.....	60
3.3.3.2 Avaliação da atividade antimicrobiana.....	61
3.3.3.3 Elucidação estrutural do componente majoritário da fração da água de diálise.....	63
4. DISCUSSÃO GERAL	69
5 CONCLUSÕES	75
6.PERSPECTIVAS	77
7. REFERÊNCIAS	79

1. INTRODUÇÃO GERAL

1.1 Esponjas marinhas e microrganismos associados

No início dos anos sessenta, o aumento da necessidade por fármacos capazes de controlar novas doenças e microrganismos resistentes estimulou a procura por novas fontes não convencionais de produtos naturais bioativos. A descoberta de grandes quantidades de prostaglandinas em um octocoral despertou o interesse nas pesquisas em produtos marinhos, e gerou um grande investimento por parte das indústrias farmacêuticas na busca de substâncias ativas a partir dos organismos que vivem nos oceanos¹. Desde então, diversos laboratórios, principalmente nos Estados Unidos, Austrália e Itália, têm se dedicado ao estudo químico de esponjas, corais, moluscos, algas e microrganismos marinhos. Muitas substâncias identificadas possuem estruturas químicas únicas e sem precedentes em fontes naturais terrestres, fato que tem motivado, além do desenvolvimento de novos métodos de isolamento e de síntese orgânica, pesquisas sobre a origem e biossíntese das substâncias isoladas, sua importância ecológica e suas atividades farmacológicas.

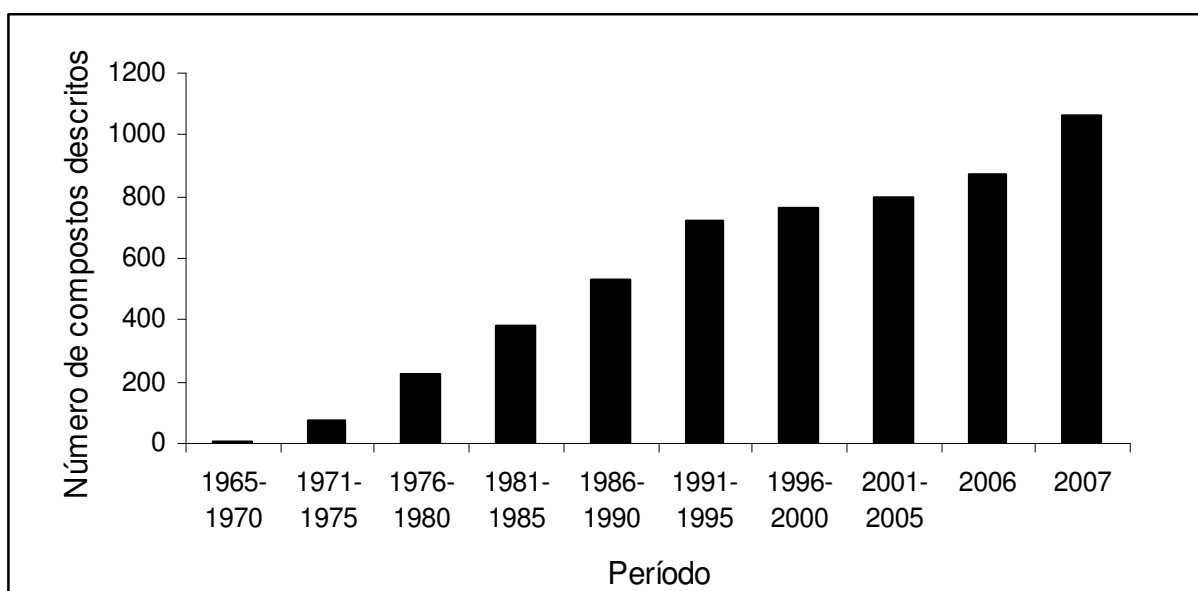


Figura 1.1: Número de produtos naturais marinhos descritos no período de 1965 a 2007. (adaptada de Blunt *et al*¹⁰).

A busca por novos compostos de organismos marinhos resultou no isolamento de aproximadamente 10.000 metabólitos nos últimos 50 anos, muitos dos quais, dotados de propriedades farmacológicas, dentre elas: antibióticas, antifúngicas, citotóxicas, neurotóxicas, antimitóticas, antivirais e antineoplásicas². A literatura do ano de 2007 descreve 961 novos compostos de origem marinha em 350 artigos, mostrando um aumento de 24% em relação ao número de compostos relatados em 2006³. Estas observações são mostradas graficamente na Figura 1.1, onde a média anual de compostos descritos de 1965 a 2005 são comparados com a de 2006 e 2007, e na Figura 1.2.

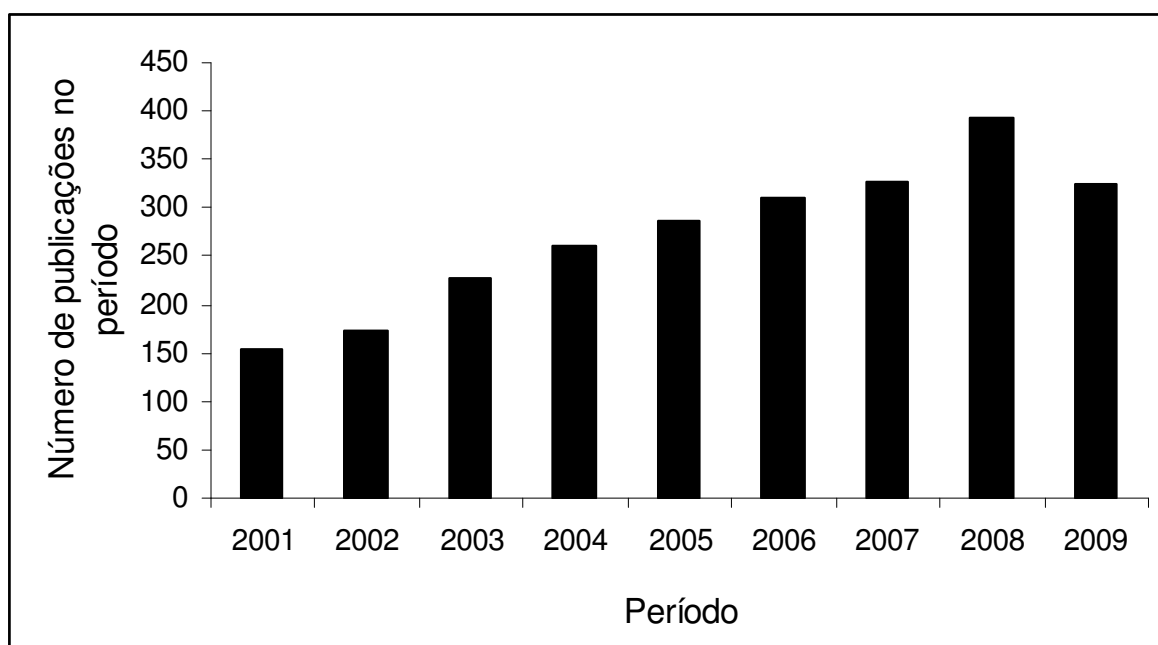


Figura 1.2: Número de artigos publicados por ano com a palavra-chave “Marine natural products”, totalizando em 3972 artigos publicados até a data da pesquisa no site da Web of Science em 2 de outubro de 2009.

Entretanto, a partir 1995 surgiram sinais de queda de interesse pela busca de novos metabólitos originários de fontes tradicionais, como macroalgas e octocorais, e uma estabilização do número anual de trabalhos sobre esponjas marinhas⁴.

As esponjas marinhas são animais que pertencem ao filo porífera (do latim *porus* “poro”; *ferre*, “possuir”) sendo os mais antigos organismos pluricelulares, tendo surgido há mais de 550 milhões de anos⁵. As esponjas variam enormemente em tamanho, algumas com tamanho de um grão de arroz enquanto outras podem exceder

um metro de altura e diâmetro, entretanto funcionam essencialmente de forma semelhante a organismos com grau de complexidade unicelular⁶. Podem ser radialmente simétricas, mas a maioria é irregular e exhibe padrões de crescimento maciço, ereto, incrustante ou ramificado, sendo comum possuírem coloração, muitas vezes por abrigarem microrganismos simbiotes que podem dar cor ao corpo da esponja ou como forma de proteção à radiação solar. A arquitetura das esponjas é única, sendo constituída ao redor de um sistema de canais de água – um arranjo correlacionado com o fato de as esponjas viverem fixas a um substrato e não possuírem mobilidade. Brevemente, a estrutura corporal de uma esponja marinha é constituída de uma superfície perfurada por muitas aberturas pequenas chamadas de poros, por onde a água penetra até alcançar uma cavidade central denominada átrio ou espongiocele. Internamente a parede do corpo é revestida pelos coanócitos, células flageladas que promovem a filtração da água capturando microrganismos e partículas alimentares nela presentes. Após a filtração, a água é expelida para o meio externo através de uma abertura maior chamada ósculo⁵ (Figura 1.3).

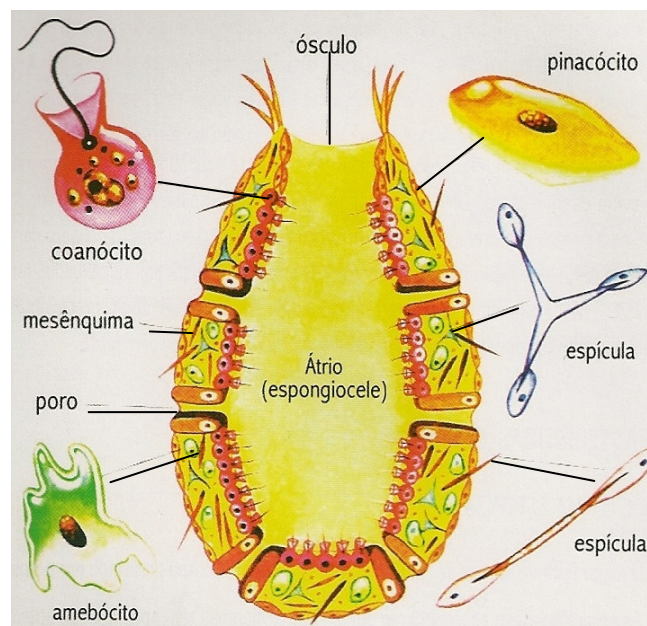


Figura 1.3: Desenho esquemático da estrutura de uma esponja marinha (adaptada de Paulino, W.R.⁷).

Segundo Vogel⁸, esponjas são uma das melhores fontes de compostos bioativos com potencial para novos fármacos, destacando a origem química do antiretroviral AZT

e de compostos antiparasitários derivados de esponjas. Na verdade, esponjas são os maiores produtores marinhos de novos metabólitos, como mais de 200 metabólitos sendo descritos a cada ano^{9,10} (Figura 1.4). Além disso, mais compostos derivados de esponjas estão em ensaios pré-clínicos e clínicos (como agentes anticâncer e antiinflamatório) do que compostos de outros filos marinhos⁹.

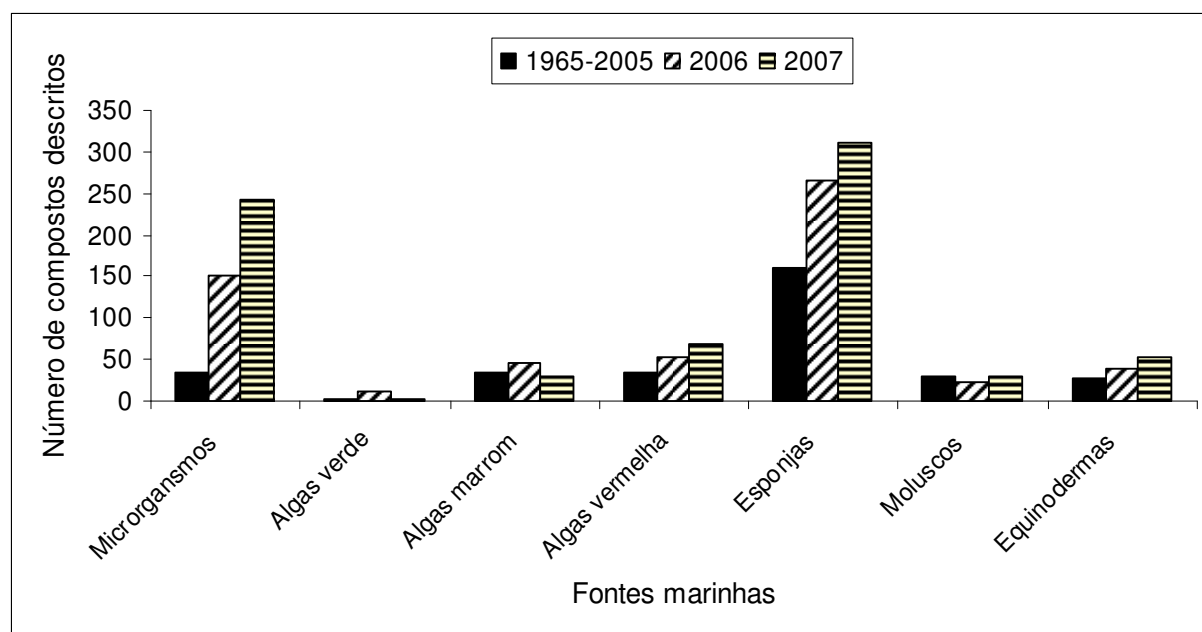


Figura 1.4: Número de compostos descritos no período de 1965 a 2007 a partir de diferentes fontes marinhas (adaptada de Blunt *et al*¹⁰).

Em grande expansão encontram-se as pesquisas com os microrganismos, devido às suspeitas de que parte da capacidade biossintética das esponjas marinhas parece estar associada com os microrganismos simbiotes que se encontram embebidos na matriz tecidual ou na superfície das mesmas^{2,8}. Conforme a Figura 1.4 observa-se um aumento notável de 600 % no número de compostos descritos na categoria microrganismos no ano de 2007 quando comparado com a média dos anos de 1965 a 2005, demonstrando o claro crescimento de interesse em fungos e bactérias de origem marinha. Aliado a isto, os microrganismos, diferentemente dos macrorganismos marinhos, podem ser facilmente mantidos em laboratório, sendo passíveis de cultura em larga escala, o que facilita a obtenção dos compostos para pesquisa e para subsequente maior produção. A presença de compostos estruturalmente similares em esponjas não relacionadas fortalece a especulação da origem microbiana de tais substâncias^{8,9}.

A evolução e a sobrevivência destes microrganismos em um local tão peculiar (na superfície ou no interior de uma esponja, em ambiente salino e com maior pressão) resultaram em organismos que produzem substâncias únicas, com funções ecológicas diversas como forma de defesa contra inimigos naturais, tais como predadores e competidores^{1,2}. Como exemplo, a briostatina, agente anticâncer em fase de testes clínicos, atua no briozoário *Bugula neritina*, do qual foi isolado, como inibidor do ciclo celular, impedindo a proliferação de organismos estranhos¹¹. Em 2001, pesquisadores da Califórnia identificaram a bactéria do briozoário *Bugula neritina* responsável pela produção da briostatina¹².

Recentes estudos vêm sendo realizados utilizando microrganismos associados a esponjas como fonte de novas moléculas bioativas. O Brasil é rodeado por águas, sendo um dos países do mundo com maior biodiversidade, constituindo uma rica reserva de moléculas potencialmente ativas. Entretanto, permanece como o 12º colocado em termos de publicação sobre produtos naturais marinhos (Figura 1.5), indicando que grande parte desta biodiversidade permanece desconhecida e/ou explorada por grupos de pesquisa estrangeiros.

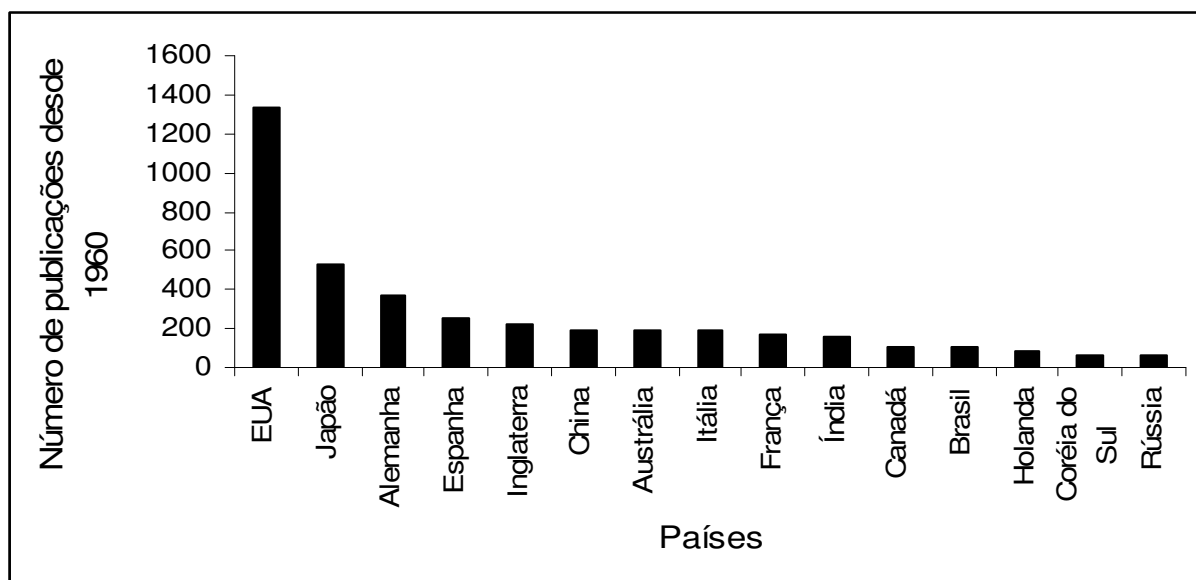


Figura 1.5: Número de artigos publicados desde 1960 e respectivos países de origem com a palavra-chave “Marine natural products”. Pesquisa no site da Web of Science em 2 de outubro de 2009.

A grande quantidade e diversidade de atividades biológicas encontradas nestes trabalhos^{13,14} estimulam novas pesquisas em microrganismos associados a esponjas marinhas, os quais representam um campo de estudo promissor na descoberta de novos compostos biologicamente ativos e incentivam a utilização do potencial oferecido pela biodiversidade brasileira como fonte de moléculas para geração de novos produtos.

1.2 Biofilmes microbianos

Uma das fundamentais características do mundo microbiano é sua diversidade metabólica e sua capacidade de adaptação a estresses ambientais. As bactérias existem em dois estados de vida básicos: como células planctônicas também conhecidas como células de vida livre ou como células sésseis também conhecidas como biofilmes. Acredita-se que células planctônicas são importantes para a rápida proliferação e propagação para novos territórios enquanto as células sésseis caracterizam a cronicidade.

Biofilmes têm sido descritos em muitos sistemas desde que Antony van Leeuwenhoek, em 1675, examinou “pequenos animais” no seu próprio dente, mas a teoria geral da existência de biofilmes não foi promulgada até 1978¹⁵. Estudos têm revelado que a maioria das bactérias não cresce como células individuais, mas em comunidades organizadas como organismos pseudomulticelulares, ou biofilmes, estando presentes em praticamente todos os ecossistemas naturais e patogênicos^{16,17}. Na verdade, a vida em consórcio representa grande vantagem em diversas situações, possibilitando benefício mútuo dos seus integrantes, tornando-os capazes de sobreviver em ambientes hostis, como em locais com temperaturas extremas¹⁸, pH muito ácido¹⁸, e em ambientes altamente poluídos¹⁹. Desde então, grandes esforços têm sido feitos para se entender este complexo modo de vida microbiano.

O desenvolvimento de um biofilme inicia quando uma bactéria planctônica se adere a uma superfície biótica ou abiótica. Após a adesão inicial, as células passam por mudanças fisiológicas programadas formando microcolônias encapsuladas por uma matriz protetora composta de uma substância extracelular polimérica (EPS), caracterizando uma adesão irreversível. Essas microcolônias são separadas por canais

de água, formando estruturas semelhantes a cogumelos, que funcionam como um sistema circulatório de entrega de nutrientes e remoção de metabólitos. Ocorre a maturação e o desenvolvimento do biofilme, levando à formação de uma comunidade sésil microbiana altamente estruturada e dinâmica^{20,21}. Sob determinadas circunstâncias, quando o ambiente não se encontra mais favorável ou ainda devido a uma programação celular para a virulência, ocorre o desprendimento de células planctônicas ou até de grupos de células unidas pelo EPS podendo colonizar um novo local (Figura 1.6).

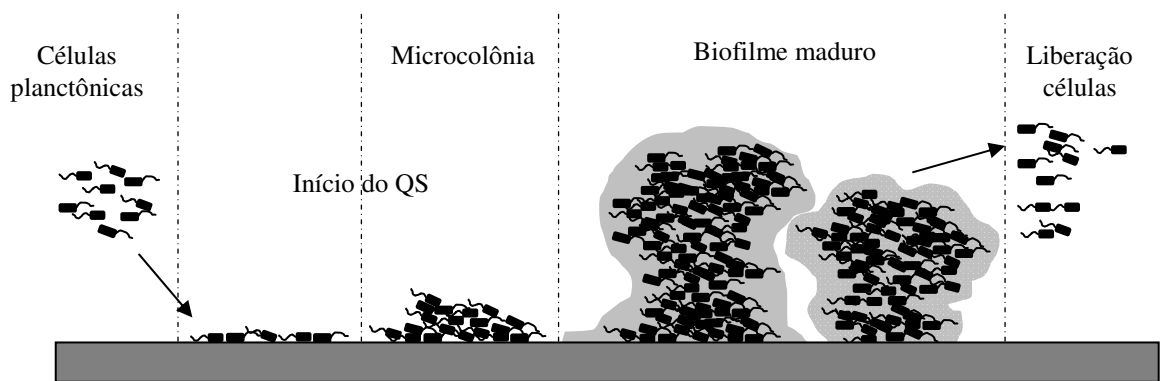
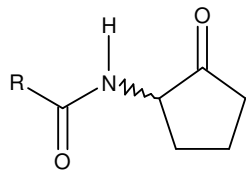


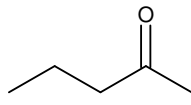
Figura 1.6: Estágios do desenvolvimento dos biofilmes.

Recentes avanços na pesquisa sobre comunicação celular bacteriana têm demonstrado o envolvimento de sinalizadores químicos em biofilmes bacterianos²². Pequenas moléculas, conhecidas como autoindutoras, são produzidas, liberadas e detectadas por células bacterianas no ambiente, podendo interagir com células vizinhas. Conforme a densidade bacteriana aumenta, as moléculas autoindutoras podem acumular a um limiar de concentração e induzir a transcrição de genes específicos. Este processo de comunicação encontrado em muitas bactérias patogênicas, que acopla a transcrição de genes específicos com a densidade celular bacteriana, é referido como *Quorum sensing* (QS)^{23,24}. Diversos sinais têm sido descobertos, dentre eles estão as acilhomoserinolactonas (AHL) ou autoindutor-1 em bactérias Gram-negativas²⁵, peptídeos cíclicos em Gram-positivas²⁶ e um sinalizador de ambos microrganismos, o furanosil diester borato ou autoindutor-2²⁷ (Figura 1.7).

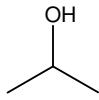
Acilhomoserinolactonas (AHL) ou autoindutor 1:



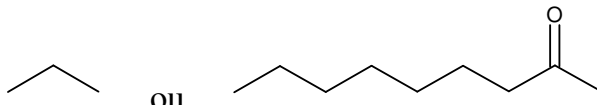
Grupos R:



Vibrio fischeri

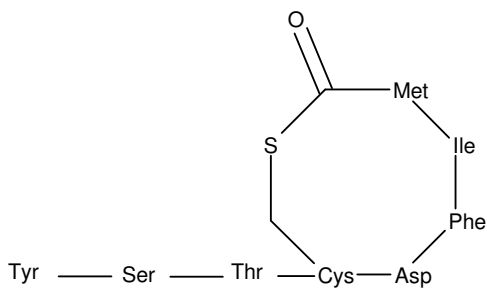


Vibrio harveyi

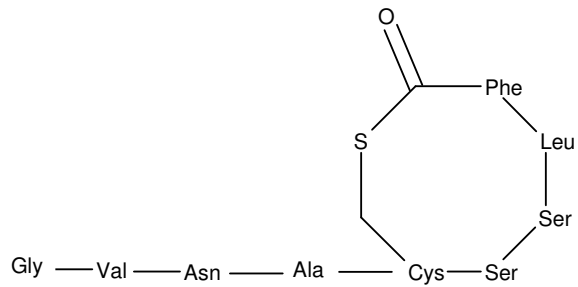


Pseudomonas aeruginosa

Peptídeos cíclicos ou oligopeptídeos autoindutores (AIP):

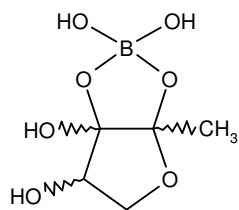


AIP –I: *Staphylococcus aureus*

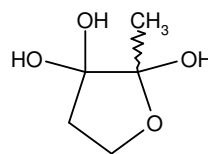


AIP –II: *Staphylococcus aureus*

Autoindutor 2:



Salmonella typhimurium



Vibrio harveyi

Figura 1.7: Principais moléculas autoindutoras usadas na sinalização bacteriana. (adaptada de Ryan. e Dow²⁸).

O sistema QS é evidente em muitos patógenos humanos comuns, diferindo entre bactérias Gram-negativas e Gram-positivas. De maneira geral, bactérias Gram-negativas produzem constitutivamente autoindutores, principalmente na forma de AHL. Quando uma concentração significativa da molécula sinal é acumulada, indicando uma alta densidade celular, ocorre difusão das mesmas do meio extracelular para o intracelular e a ligação destas moléculas a um receptor, modulando positivamente a transcrição de genes alvos²⁴.

Já as bactérias Gram-positivas utilizam um sistema sensorial de dois componentes para a detecção de oligopeptídeos, e as moléculas autoindutoras. Os peptídeos são clivados a partir de um precursor de peptídeos, os quais então são modificados para conter anéis lactonas e tiolactonas²⁹. Estes peptídeos não são difusíveis pelas membranas e são transportados através de exportadores para o espaço extracelular. Quando alcançam um nível crítico, são reconhecidos por um sensor proteína quinase transmembrana, o qual é ativado, iniciando a transferência de fosfato para uma proteína reguladora de resposta intracelular, responsável por modular a transcrição de genes alvos.

Similarmente às bactérias Gram-negativas, cada sistema peptídeo autoindutor em bactérias Gram-positivas é espécie-específico³⁰ (Figura 1.8). O QS atua como regulador central da expressão de virulência, controlando uma variedade de fenótipos, tais como a formação de biofilmes, a produção de toxinas, produção de exopolissacarídeos, produção de fatores de virulência e motilidade, os quais são essenciais para o sucesso do estabelecimento de uma relação entre um simbionte ou patógeno com seu hospedeiro^{31,32,33,34,35}. Este sistema também se demonstra envolvido com a tolerância dos biofilmes aos compostos antimicrobianos. Davies e colaboradores mostraram que mutações nos genes que controlam a biossíntese das AHL alteram a diferenciação de biofilmes de *Pseudomonas aeruginosa* levando à formação de fenótipos com biofilmes menos espessos e mais suscetíveis aos biocidas²².

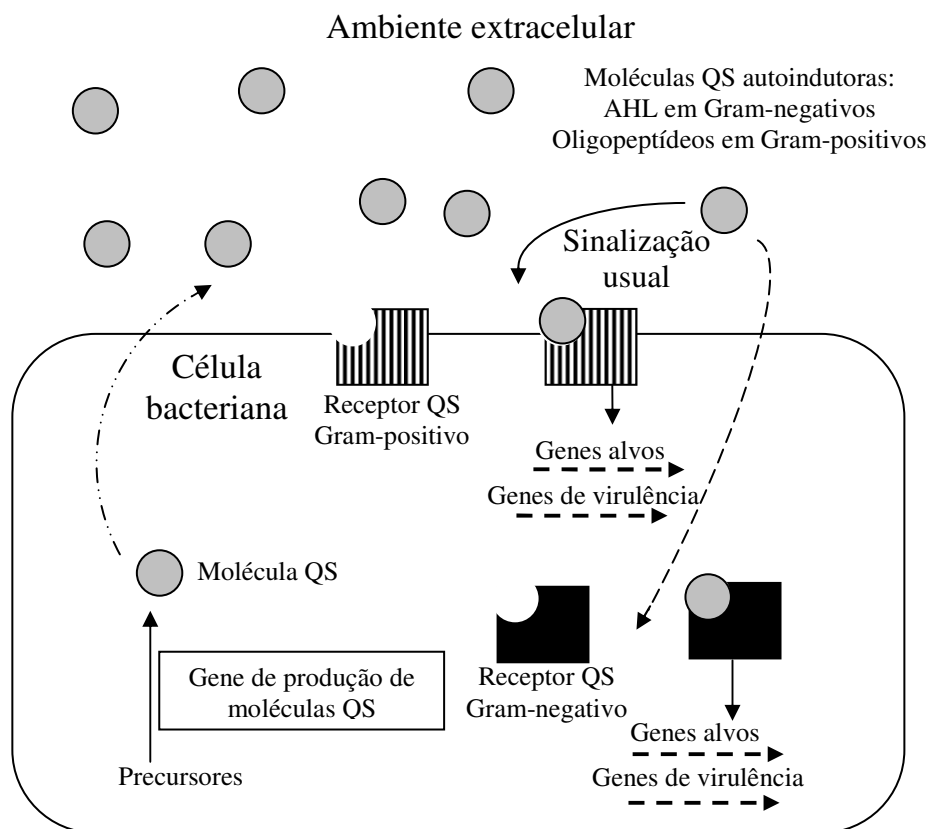


Figura 1.8: Sistema *Quorum sensing* em bactéria Gram-positiva (caixas listradas) e em bactéria Gram-negativa (caixas pretas).

A formação do biofilme tem um papel importante na patogênese, representando um grande obstáculo para a saúde humana, sendo causa comum de infecções persistentes³⁶. Na verdade, bactérias que vivem nestas comunidades são frequentemente de 10 a 1000 vezes mais tolerantes aos antimicrobianos do que quando na forma planctônica²⁰. Diversos fatores podem ser considerados para a resistência das células na forma de biofilmes, incluindo:

a) Baixa penetração de agentes químicos: A substância extracelular polimérica (EPS) reduz a penetração de antimicrobianos e biocidas, seja por atuar como barreira física para difusão, retendo grande parte dos agentes antimicrobianos e assim reduzindo a quantidade do mesmo para interagir com as células, ou por interagir quimicamente com estes compostos, onde o EPS atua como um trocador iônico e sequestra antimicrobianos hidrofílicos e carregados positivamente tais como os aminoglicosídeos³⁷.

b) Lento crescimento de células no interior do biofilme: As células bacterianas em biofilmes constituem populações heterogêneas com variadas taxas de crescimento em diferentes compartimentos do biofilme e variada suscetibilidade aos antimicrobianos³⁸. A reduzida taxa metabólica de algumas células bacterianas, conhecidas como células dormentes, particularmente aquelas que se encontram na base da estrutura dos biofilmes, onde há limitação de oferta de oxigênio, garante a resistência ao tratamento com antimicrobianos - atuando como núcleo para re-infecção - que agem na fase de crescimento bacteriano como síntese protéica, síntese de ácidos nucléicos e de parede celular, podendo explicar a baixa susceptibilidade às penicilinas, aos aminoglicosídeos e às quinolonas (Figura 1.9).

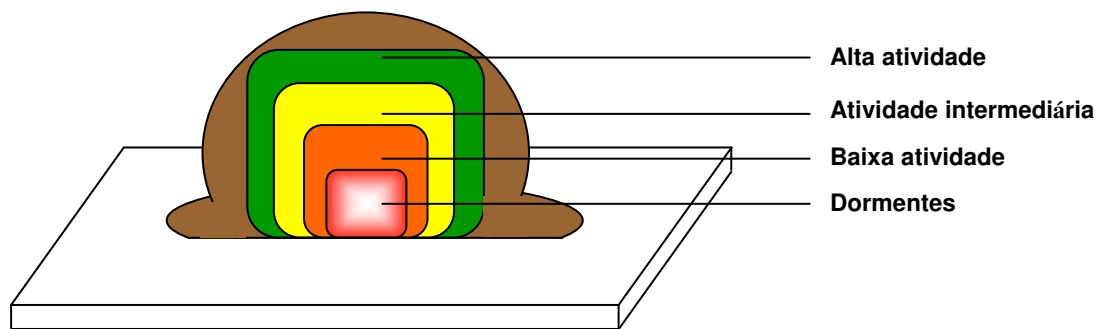


Figura 1.9: Atividade metabólica em uma microcolônia de biofilme (adaptada de Davies, D.²⁰).

c) Transferência de genes de resistência: Biofilmes são idealmente adequados para a troca de material genético devido à proximidade das células bacterianas¹⁷.

Walters e colaboradores compararam a penetração de antimicrobianos, a limitação de oxigênio e efeitos da atividade metabólica na tolerância de biofilmes de *P. aeruginosa* ao ciprofloxacino e à tobramicina. Os resultados sugerem que a limitação de oxigênio e a baixa atividade metabólica no interior dos biofilmes, mais do que a penetração do antimicrobiano, sejam os responsáveis pela tolerância a estes antimicrobianos³⁹. Assim, a resistência inerente desta organização aos agentes antimicrobianos se deve tanto à natureza da estrutura dos biofilmes bem como à fisiologia das células bacterianas que os compõem. Alia-se ainda, a dificuldade de reconhecimento dos biofilmes pelo sistema imune, devido à presença do EPS, levando-os à fuga da defesa imunológica humana.

Biofilmes estão associados com mais de 65 % de todas as infecções médicas, incluindo endocardites, otites, prostatites, periodontites, conjuntivites, vaginites, infecções relacionadas à fibrose cística e como importantes colonizadores de implantes médicos, tais como cateteres venosos, arteriais e urinários, assim como de próteses⁴⁰.

O papel do QS em infecções bacterianas é ainda parcialmente compreendido. Além disso, este sistema apresenta grande complexidade e seu funcionamento pode variar não apenas entre gênero, mas também entre espécies bacterianas. Entretanto, acredita-se fortemente que o entendimento deste fenômeno possa possibilitar o desenvolvimento de promissoras quimioterapias anti-infecciosas, sendo a intervenção no sistema QS um alvo estratégico neste combate.

1.3 Estratégias de combate aos biofilmes microbianos

Segundo dados da Organização Mundial da Saúde (WHO), as doenças infecciosas causam 25% das mortes em todo o mundo e 45% nos países menos desenvolvidos⁴¹. O tratamento tradicional das doenças infecciosas é baseado em compostos capazes de matar ou inibir o crescimento bacteriano, onde a maior preocupação desta abordagem é o frequente aparecimento da resistência aos antimicrobianos.

Os biofilmes microbianos são altamente tolerantes aos agentes antimicrobianos, sendo que as concentrações necessárias para erradicá-los frequentemente excedem a maior dose disponível, impossibilitando tratamentos eficientes baseados na terapia convencional^{16,42}. Poucos antimicrobianos com novos mecanismos de ação têm sido encontrados. Os mecanismos de resistência espalhados nas populações bacterianas patogênicas indicam a necessidade de novos alvos bacterianos. Assim sendo, a inibição de alvos de virulência pode trazer moléculas com novos mecanismos de ação representando um conceito inovador de terapêutica^{43,44}.

A descoberta de sistemas de comunicação (sistemas QS) reguladores da virulência bacteriana tem proporcionado uma nova oportunidade de controlar infecções bacterianas, abrindo possibilidades para a criação de novos fármacos

antivirulência não antimicrobianos. Compostos antivirulência possuem vantagens em relação aos antimicrobianos em dois sentidos. Primeiramente, devido ao fato de os antimicrobianos interferirem em funções que são essenciais para o metabolismo básico do microrganismo, diferentemente dos compostos antivirulência que afetam funções que são essenciais para a interação hospedeiro-patógeno, permitindo a multiplicação bacteriana no hospedeiro. Desta maneira, a pressão seletiva para a viabilidade de mutantes que potencialmente carreguem genes de resistência deve ser limitada aos tecidos do hospedeiro, local onde o determinado fator de virulência é indispensável para a sobrevivência bacteriana^{45,46}. Em segundo lugar, a especificidade de efeito, ou seja, sendo ativo contra determinado tipo bacteriano que esteja causando patogênese, preservando a microbiota normal constitutiva⁴⁷.

Interessantemente, compostos capazes de alterar os sinais de comunicação do sistema QS e, portanto, modular a formação dos biofilmes bacterianos, estão sendo encontrados no ambiente marinho^{48,49,50,51,52}.

As estratégias para o combate de biofilmes podem ser divididas em dois segmentos: a inibição da formação de biofilmes e o tratamento de biofilmes já formados. A figura 1.10 mostra os principais alvos para intervenção.

A inibição da formação de biofilmes em um substrato abiótico pode ser feita através da inibição da adesão celular bacteriana ao mesmo (Figura 1.10, etapa 1), obtida pelo desenvolvimento de superfícies com características físicas de antiaderência, evitando interações hidrofóbicas e/ou eletrostáticas que medeiam a adesão primária às superfícies abióticas⁵³, ou ainda pelo recobrimento de superfícies com compostos capazes de interferir na comunicação inicial bacteriana, também chamados de compostos inibidores do sistema QS (QSI). Esta 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, sendo que o próprio ambiente oferecido pelo implante facilita a colonização por microrganismos oportunistas⁵⁴. Para a inibição da adesão celular bacteriana a um substrato biótico, estão em estudo compostos pilicidas, que diminuem

a formação de *pili*, uma das estruturas bacterianas responsáveis pela adesão às células humanas, como alternativa para evitar a adesão bacteriana de *Escherichia coli* às células da bexiga e assim impedir a formação de biofilmes⁵⁵.

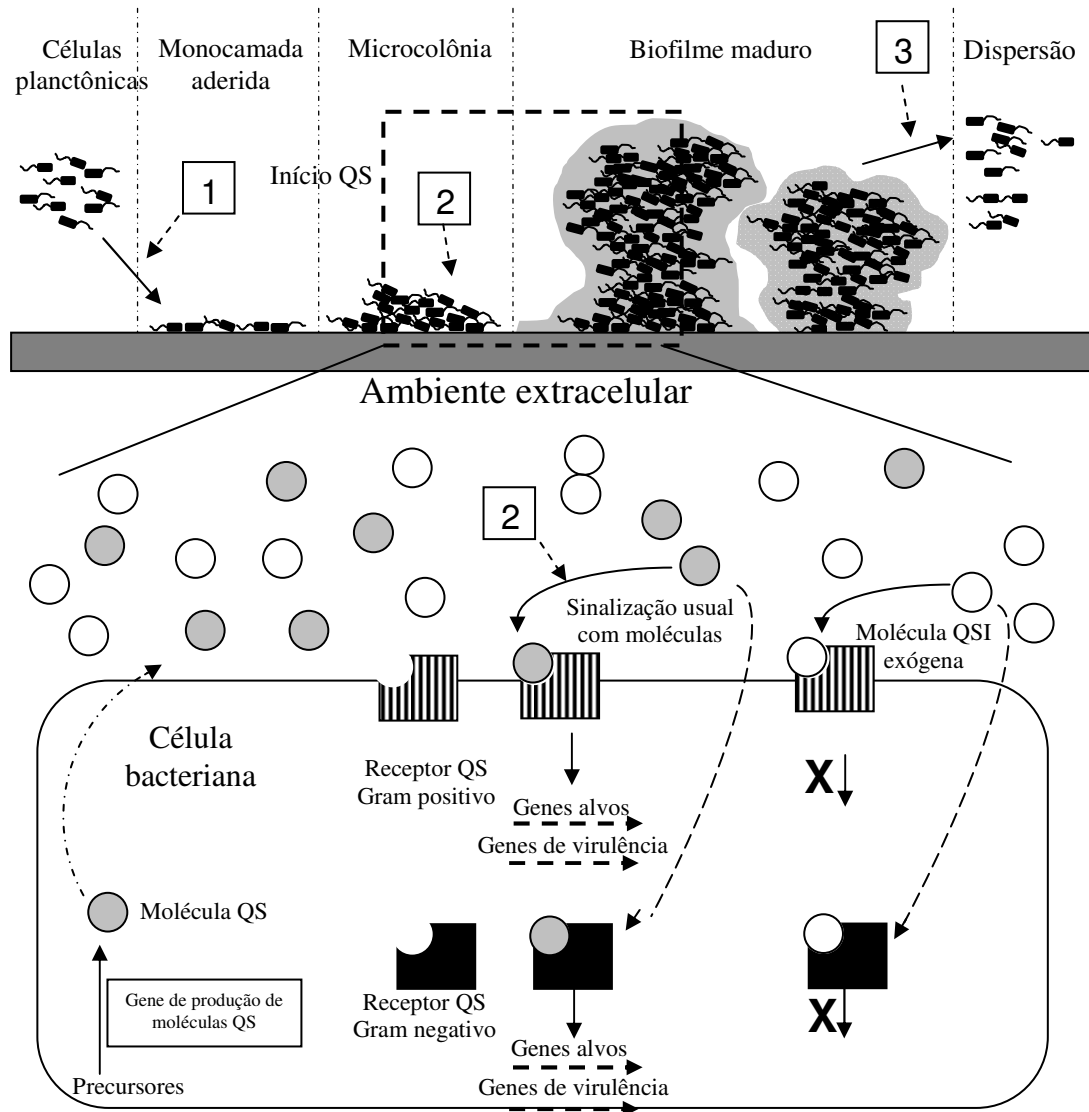
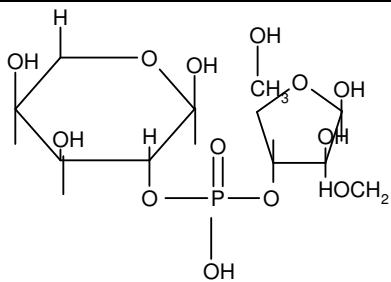
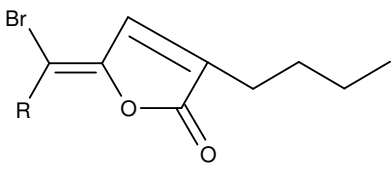
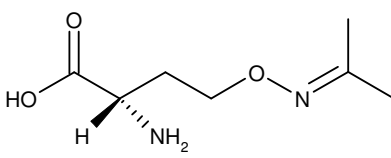
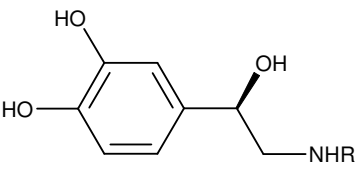
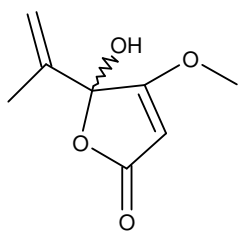
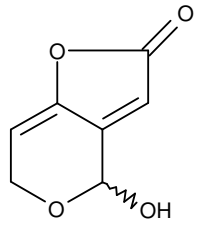


Figura 1.10: Principais alvos para combate aos biofilmes microbianos. De maneira genérica: círculos cinza representam moléculas autoindutoras QS ligando-se aos receptores QS em bactéria Gram-positiva, as caixas listradas, e em bactéria Gram-negativa, as caixas pretas. Círculos branco representam moléculas inibidoras/moduladoras do sistema QS, competindo pelo sítio de ligação das moléculas autoindutoras e evitando a transcrição dos genes de virulência.

A inibição da formação de biofilmes também pode ser obtida por meio do rompimento da comunicação célula-célula envolvida na formação dos biofilmes, após ocorrer a adesão bacteriana primária, com o uso de QSI, inibindo a produção de EPS e

dificultando a manutenção da estrutura tridimensional dos biofilmes (Figura 1.10, etapa 2). Alguns inibidores do sistema QS podem ser encontrados na tabela 1.1.

Tabela 1.1: Compostos inibidores do sistema *Quorum sensing* produzidos por eucariotos (adaptada de González e Keshavan²³).

Composto QSI	Estrutura	Grupo R	Fonte	Sistema QS afetado
Agrocinopina B			Plantas	Sistema Tra de <i>Agrobacterium tumefaciens</i>
Furanona		H ou Br	Alga <i>Delisea pulchra</i>	Sistema Swr de <i>Serratia liquefaciens</i> e outros Gram-negativos
L-canavanina			Medicago <i>sativa</i>	Sistema Sin/ExpR de <i>Sinorhizobium meliloti</i>
Norepinefrina Epinefrina		H ou CH ₃	Hormônios humanos	Sistema AI3 de <i>Escherichia coli</i> enterohemorrágica
Ácido penicílico			<i>Penicillium</i> spp.	Sistema Las e RhI de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>
Patulina			<i>Penicillium</i> spp.	Sistema Las e RhI de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>

Por fim, o tratamento de biofilmes já formados pode ser alcançado através do uso de proteases ou outras enzimas capazes de desintegrar a matriz que engloba as células bacterianas⁵⁶. Ainda, através do uso de moléculas que estimulem a produção destas proteases pelas próprias células bacterianas, estimulando o mecanismo natural de dispersão de biofilmes⁵⁷ (Figura 1.10, etapa 3).

Para estabelecer uma infecção e produzir uma doença, bactérias patogênicas devem desenvolver diferentes mecanismos de virulência para colonizar, disseminar e se adaptar aos vários microambientes impostos. Acredita-se que os moduladores do QS exógenos sejam capazes de tornar os microrganismos mais suscetíveis aos antimicrobianos e ao sistema imune. Desta maneira, em combinação com antimicrobianos tradicionais, esses novos interferentes do sistema QS podem aumentar a efetividade dos fármacos correntemente utilizados, facilitando o controle de infecções bacterianas relacionadas a biofilmes.

1.4 *Staphylococcus epidermidis*

O nome *Staphylococcus* é derivado da palavra grega *staphylé*, que significa cacho de uva, devido ao fato destes cocos Gram-positivos crescerem agrupados (Figura 1.11), embora possam aparecer no material clínico como células isoladas, aos pares ou em cadeias curtas. Apresentam diâmetro compreendido entre 0.5 a 1.5 μm , são microrganismos imóveis, que não formam esporos, geralmente catalase positivos, tipicamente não encapsulados, anaeróbios facultativos ou aeróbios⁵⁸.

Atualmente o gênero *Staphylococcus* compreende 37 espécies⁵⁸, as quais podem ser divididas em dois grandes grupos: coagulase positivo, no qual o *S. aureus* é a espécie patogênica exclusiva em humanos, capaz de produzir a enzima responsável pela coagulação da fibrina no sangue, e o coagulase negativo, no qual se enquadram as demais espécies, comumente referidas como *Staphylococcus* coagulase negativos (SCN). As espécies de *Staphylococcus* mais comumente associadas à doença humana são o *S. aureus*, o *S. epidermidis*, o *S. saprophyticus*, o *S. capitis* e o *S. haemolyticus*⁵⁸.

Os SCN constituem a maior parte das bactérias pertencentes à microbiota normal humana, sendo colonizadores da pele e membrana mucosa. Dentre eles, o *S. epidermidis* é a espécie mais frequentemente isolada e responsável pelas infecções, contando com aproximadamente 40 % das causas de bacteremia nosocomial⁵⁹. No passado, SCN eram considerados não patogênicos e seu isolamento no laboratório estava atribuído às contaminações das amostras

O papel dos SCN como patógenos nosocomiais tem sido reconhecido e bem documentado a partir das duas últimas décadas, especialmente para a espécie *S. epidermidis*⁶⁰. Na verdade, a conversão dos SCN de microrganismos simbioses para patógeno humano é reflexo direto do aumento do uso de implantes médicos utilizados para a substituição intermitente ou permanente de órgãos e ainda para o manejo de funções vitais em unidades de tratamento intensivo⁶¹.

Staphylococcus epidermidis possui poucos fatores de virulência, sendo capaz de expressar determinantes que provocam sua persistência, como as moléculas promotoras da evasão ao sistema imune e as que medeiam a formação de biofilmes. Em menor proporção, encontram-se os determinantes que agressivamente atacam o hospedeiro, como as toxinas.⁶² Esta espécie apresenta uma substancial adaptação em nível de genoma para o crescimento na forma de biofilmes, incluindo o *downregulation* de processos celulares básicos como biossíntese de ácidos nucleicos, de proteínas e de parede celular, fato que associa a formação de biofilmes por *S. epidermidis* à sua patogenicidade⁶³.

Assim, o principal fator de risco para infecção com SCN inclui a presença de implantes biomédicos, como cateter venoso central, prótese de articulações, marca-passos cardíacos, válvulas cardíacas, lentes artificiais, implantes mamários, stents, dentre outros. As infecções relacionadas a implantes médicos passaram a representar um sério problema, dado que a maioria dos pacientes que internam passa por procedimentos onde se faz necessário a inserção de dispositivos. Aliado a este fato, genes de resistência específica aos antimicrobianos são amplamente distribuídos em *S. epidermidis*.

O aumento nos níveis de resistência aos agentes antimicrobianos usados na terapia, incluindo aminoglicosídeos, quinolonas, tetraciclina, macrolídeos, lincosamidas, e trimetoprima-sulfametoxazol tornam as infecções causadas por *S. epidermidis* extremamente difíceis de tratar⁵⁸. Em muitos países, incluindo os Estados Unidos, conforme estudos do SENTRY, 75-90 % de todos os isolados hospitalares de *S. epidermidis* são resistentes à meticilina, o fármaco de primeira escolha contra infecções estafilocócicas, sendo maior do que a taxa correspondente ao *S. aureus* (40-60 %)⁶⁴. Além disso, amostras coletadas em um período de oito anos (1988-1995) no Canadá, mostraram um aumento de resistência à ceftazidima de 20 %, à oxacilina de 17 %, ao norfloxacino de 15 %, ao ciprofloxacino de 14 %, ao ácido fusídico de 12 % e à cefoxitina de 10 %. Em comparação, neste mesmo período, *S. aureus* apresentaram aumento significativo de resistência ao ciprofloxacino de 7 %, ao norfloxacino de 6 %, e à ceftazidima de 4 %, indicando uma diferença considerável no perfil de resistência entre *Staphylococcus* coagulase negativo e coagulase positivo⁶⁵.

Devido à grande resistência à meticilina e aos outros antimicrobianos, 80 % dos cateteres infectados com *Staphylococcus* spp. vem sendo tratados com vancomicina, sem a remoção do mesmo⁶⁶. Entretanto, resistência intermediária a vancomicina já vem sendo descrita⁶⁷ e a formação de biofilmes significativamente diminui a atividade deste e de outros antimicrobianos^{68,69}.

1.5 *Pseudomonas aeruginosa*

Pseudomonas é um grande e complexo gênero formado por bacilos Gram-negativos, incluindo espécies de importância clínica e ambiental (Figura 1.12). O gênero *Pseudomonas* constitui o grupo mais importante entre os bacilos Gram-negativos não fermentadores de glicose e não fastidiosos. São microrganismos aeróbicos, catalase positivos, que não formam esporos, possuindo de 0.5 a 1.0 µm por 1.5 a 5.0 µm, geralmente móveis, que apresentam um ou mais flagelos polares⁷⁰.

Estes bacilos são ubíquos no ambiente, podendo se adaptar a uma variedade de nichos devido à sua habilidade de crescer em temperatura variando de 4 a 42 °C e de utilizar diferentes moléculas orgânicas como fonte de carbono. *P. aeruginosa* pode ser

encontrada no solo, na água, em plantas e ainda em solução antissépticas. Entretanto, nenhum desses reservatórios ambientais gera um grande risco de infecção aos indivíduos imunocompetentes, onde a ingestão do microrganismo não parece induzir colonização gastrointestinal ao menos que uma antibioticoterapia tenha alterado a microbiota bacteriana normal⁷⁰.

Pseudomonas aeruginosa é um patógeno oportunista geralmente encontrado em indivíduos imunocomprometidos, incluindo pacientes com severas queimaduras, pacientes com câncer, com o vírus da imunodeficiência humana e portadores de fibrose cística (FC). Este microrganismo pode causar 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 peritonites⁷⁰.

A morbidade e mortalidade associada à fibrose cística, a doença autossômica recessiva mais comum entre os caucasianos (frequência de 1: 2500 nascidos vivos)⁷¹, são causadas pela colonização crônica dos pulmões por microrganismos. Embora várias espécies microbianas possam colonizar com sucesso os pulmões de pacientes com FC, infecções por *P. aeruginosa* contribuem mais significativamente para a doença. Como este microrganismo se adapta ao ambiente pulmonar, é capaz de estabelecer uma infecção crônica, tornando-se o patógeno predominante na FC, o qual tem sido objeto de intensa investigação. Neste contexto, *P. aeruginosa* é inerentemente refratária a vários antimicrobianos, especialmente quando embebidas no excessivo muco produzido por estes pacientes.

Pseudomonas aeruginosa produz uma variedade de fatores de virulência que promovem o dano tecidual e a fuga ao sistema imune do hospedeiro. Estes podem ser proteínas ou compostos redox que penetram e matam as células do hospedeiro ou enzimas que rompem as membranas celulares e os tecidos conectivos.

A piocianina, de *pyocyaneous*, significando pus azul⁷², é uma fenazina que, na ausência de fosfato e na presença excessiva de ferro, mata microrganismos competidores⁷³ e células mamíferas⁷⁴ através do dano oxidativo. Além disso,

P. aeruginosa é capaz de formar biofilmes de duas maneiras: através da adesão direta do microrganismo às superfícies ou ainda através da formação de biofilmes dentro de uma espessa matriz sem a necessidade de contato direto com uma superfície, como no caso do muco de pacientes portadores de FC⁷⁵. Quando cresce na forma de biofilme, *P. aeruginosa* pode secretar uma série de exopolissacarídeos, destacando-se o exopolissacarídeo conhecido como alginato, um polímero de ácido manurônico e ácido glicurônico, caracterizando seu fenótipo mucóide (Figura 1.13)⁷⁶. A conversão das microcolônias de *P. aeruginosa* do fenótipo não mucóide para o fenótipo mucóide marca a transição para um estado de persistência, caracterizado pela resistência aos antimicrobianos, ineficácia do sistema imune e acelerado declínio da função pulmonar, tornando a infecção por *P. aeruginosa* mucóide o principal patógeno da FC^{77,78,79}.

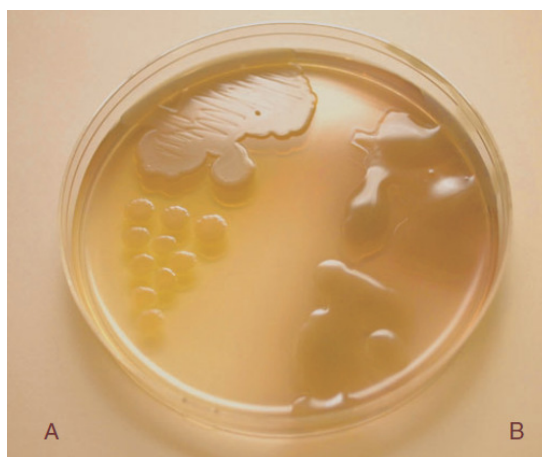


Figura 1.11: Produção de alginato por *Pseudomonas aeruginosa*. Em A, cepa não mucóide (PA01). Em B, isolado mucóide de paciente com fibrose (adaptada de Ramsey e Wozniak⁷⁶).

Pseudomonas aeruginosa possui os quatro mecanismos de resistência: a expressão de β -lactamase AmpC cromossomal induzida, a qual rende resistência à ampicilina, amoxicilina, amoxicilina-clavulanato, cefotaxima e ceftriaxona, os diversos sistemas de bombas de efluxo, capazes de expulsar o agente antimicrobiano da célula, a diminuição da permeabilidade de membrana externa, dificultando a entrada de antimicrobianos na célula, e ainda a alteração do sítio de ação de alguns antimicrobianos⁷⁰.

Vários antimicrobianos podem ser utilizados no tratamento de infecções por *P. aeruginosa*, incluindo as penicilinas de amplo espectro (piperacilina e ticarcilina), certas cefalosporinas de largo espectro (ceftazidima e cefepima), carbapenêmicos (imipenem e meropenem), monobactâmicos (aztreonam), fluorquinolonas (ciprofloxacino e levofloxacino), aminoglicosídeos (gentamicina, tobramicina e amicacina) e colistina⁷⁰. Infelizmente, resistência mutacional a todos antimicrobianos pode ser desenvolvida, uma vez que *P. aeruginosa* possui a habilidade de desenvolver resistência por mutações em diferentes *loci*, seja por aquisição horizontal de genes de resistência carregado por plasmídeos, por transposons ou por integrons⁷⁰.

Mundialmente a resistência aos antimicrobianos, incluindo a resistência multifármacos (resistência a três ou mais classes de antimicrobianos) entre *P. aeruginosa* é generalizada e crescente. Conforme um estudo realizado em um período de dez anos (1993 a 2002), nos Estados Unidos, a resistência a multifármacos, incluindo ceftazidima, ciprofloxacino, tobramicina e imipenem aumentou de 4 % no início do estudo para 14 % em 2002⁸⁰, fato que demonstra a necessidade por novos fármacos com mecanismos de ação inovadores e a importância do teste de suscetibilidade para guiar o tratamento.

1.6 *Chromobacterium violaceum*

Chromobacterium violaceum foi descrito pela primeira vez por Bergonzini em 1880 e pertence à família Neisseriaceae de β -proteobacteria. É um bacilo Gram-negativo, anaeróbio facultativo, flagelado, que habita uma variedade de ecossistemas nas regiões tropicais e subtropicais, incluindo águas paradas e solos⁸¹. A principal característica deste microrganismo é a produção de um pigmento roxo, chamado de violaceína⁸² (Figura 1.14), embora cepas não pigmentadas também sejam relatadas⁸³. A produção da violaceína ocorre via ativação do sistema bacteriano QS pela produção de moléculas C6-AHL (moléculas acilhomoserinolactonas cuja cadeia lateral possui seis átomos de carbono)⁸⁴ que se ligam a receptores CviR⁸⁵.

A violaceína possui diversas atividades biológicas, incluindo atividade antileishmanial⁸⁶, antiviral⁸⁷, antitumoral⁸⁸ e anti-*Mycobacterium tuberculosis*⁸⁹.

Outras propriedades do *C. violaceum* incluem a produção de enzimas quitinolíticas⁹⁰, a síntese de bioplásticos⁹¹ e a detoxificação ambiental⁹². Atualmente, com a descoberta do sistema de comunicação bacteriano QS, *C. violaceum* vêm sendo bastante utilizado no rastreamento de moléculas moduladoras do QS. Desta maneira, a competição entre moléculas análogas ao AHL e o autoindutor C6-AHL, produzido naturalmente pelo microrganismo, evita a formação do pigmento roxo, sendo facilmente quantificável, o que serve como um biossensor de possíveis antagonistas do QS⁹³. Embora o *C. violaceum* seja uma fonte biotecnológica valiosa, é considerado um patógeno humano altamente virulento^{94,95}.

A infecção por *C. violaceum* é incomum, mas está associada a uma alta taxa de mortalidade, sendo potencialmente fatal, exigindo diagnóstico e início de tratamento precoce como redutores desse risco⁹⁶. *Chromobacterium violaceum* é capaz de causar infecções sistêmicas em animais domésticos⁹⁷ e indivíduos saudáveis. A infecção pode envolver vários órgãos, sendo muito comum a septicemia com múltiplos abscessos, predominantemente nos pulmões, fígado e baço. A sepse geralmente ocorre em pacientes imunocomprometidos, sendo a doença granulomatosa crônica um fator de predisposição às infecções por este microrganismo⁹⁸. A infecção ocorre após contaminação por exposição da pele lesada ao solo ou ambientes aquáticos e, alternativamente, infecção sistêmica através da ingestão ou aspiração de água contaminada.

Desde o primeiro caso em 1927 na Malásia, em torno de 150 casos foram relatados na literatura⁹⁹. Recentemente a infecção por este microrganismo foi relatada causando endocardite e abscesso hepático, e tratada com sucesso pela administração de meropenem e ciprofloxacino¹⁰⁰. Entretanto, alguns grupos vêm relatando a resistência deste bacilo à ampicilina, cefalosporinas, carbapenênicos e aos aminoglicosídeos^{96,101}, demonstrando a importância do diagnóstico correto e da busca de novos fármacos antimicrobianos contra *C. violaceum*.

OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Este trabalho visa obter metabólitos secundários provenientes de microrganismos associados a esponjas marinhas, os quais apresentem atividades biológicas, especialmente atividade antibiofilme e antimicrobiana.

2.2 Objetivos específicos

- Isolar bactérias associadas a esponjas marinhas coletadas na costa sul do Brasil;
- Produzir metabólitos das espécies bacterianas selecionadas;
- Testar a atividade dos filtrados previamente obtidos, principalmente quanto à capacidade de combater e/ou evitar a formação de biofilmes patogênicos de forma não antimicrobiana;
- Testar a atividade dos filtrados previamente obtidos quanto à habilidade de atuar como antimicrobiano;
- Isolar e elucidar as estruturas dos metabólitos presentes no(s) filtrado(s) eventualmente identificados como bioativos.

3. CAPÍTULOS

3.1. CAPÍTULO 1

Rastreamento de metabólitos com atividade antibiofilme e antimicrobiana produzidos por bactérias associadas a esponjas marinhas

3.1.1 INTRODUÇÃO

Microrganismos marinhos são considerados uma fonte promissora de novos fármacos devido a sua diversidade e conseqüente quimiodiversidade. Sob variações das condições ecológicas e físico-químicas dos oceanos, os microrganismos são capazes de mutar, evoluir e se adaptar rapidamente a um ambiente particular. Esta adaptação pode incluir a produção de metabólitos secundários que são importantes para a sobrevivência dos organismos de vida livre ou que vivem em associação com outros organismos marinhos¹⁰². A riqueza microbiológica dos macrorganismos marinhos indica que os estudos de cultivo são importantes para a descoberta de: (i) novos microrganismos; (ii) de novas rotas metabólicas e de (iii) novos compostos bioativos.

Kelecom (2002)², em artigo de revisão, cita que de um total de 258 substâncias isoladas de culturas de microrganismos marinhos, 79 (31%) metabólitos mostram-se biologicamente ativos (47 deles isolados de bactéria e 32 isolados de fungos). Aproximadamente 20 compostos obtidos a partir de bactérias apresentaram atividade antitumoral e igualmente 20 substâncias mostraram ação antimicrobiana. De maneira bastante semelhante, 21 % dos isolados bacterianos associados a esponjas marinhas da costa sudeste da Índia apresentaram atividade antimicrobiana de largo espectro e espécie específica frente à *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio harveyi* e *Candida albicans*¹⁰³.

Neste contexto, este estudo utilizou bactérias associadas a esponjas marinhas como fonte produtora de metabólitos bioativos. Com os filtrados obtidos a partir das bactérias marinhas foram realizados estudos de rastreamento da atividade antibiofilme frente a um modelo Gram-positivo e um Gram-negativo, bem como de atividade antimicrobiana frente aos mesmos microrganismos.

3.1.2 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1.2.1 Coleta das esponjas marinhas e isolamento bacteriano

A coleta das esponjas marinhas foi realizada na costa sul do Brasil, especificamente na Ilha do Arvoredo, Santa Catarina (27°S 16' 42.4"/48°W 22' 30.8") em novembro de 2007, em colaboração com a Prof. Dr. Cléa Lerner e Prof. Dr. Beatriz Mothes da Fundação Zoobotânica do Rio Grande do Sul.

As esponjas foram mantidas em frascos com água do mar e um fragmento foi depositado na Coleção de Poríferos no Museu de Ciências Naturais da Fundação Zoobotânica do Rio Grande do Sul, referenciado como MCNPOR 7831.

As amostras das esponjas foram vigorosamente agitadas e 75 µL da suspensão em água do mar foram inoculados em diversos meios sólidos, conforme a tabela 3.3.1. As placas foram incubadas à temperatura ambiente (22°C) durante 3 dias e o isolamento bacteriano foi realizado identificando colônias com distintas morfológicas, sendo repetidamente estriadas até a obtenção de colônias puras (Figura 3.1.1). Os isolados bacterianos foram armazenados em glicerol à -20 °C e lotes de 21 isolados foram selecionados para iniciar a fase de cultivo para produção de metabólitos.

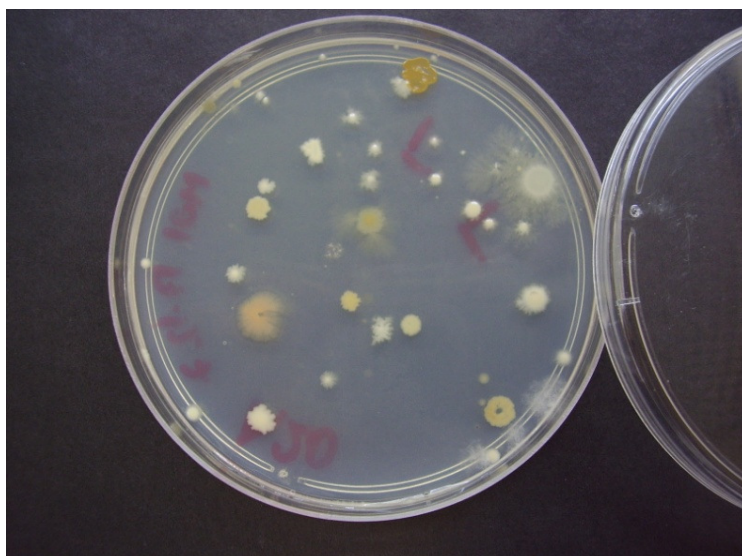


Figura 3.1.1: Crescimento em meio M1, espalhamento de 75 µL de água do mar, de bactérias e fungos associados à uma esponja marinha durante 3 dias a 22°C.

Tabela 3.1.1: Composição dos meios de cultura sólidos para isolamento bacteriano das esponjas marinhas.

Meio	NaCl	MgCl ₂ 6H ₂ O	MgSO ₄	K ₂ HPO ₄	CaCl ₂ . 2 H ₂ O	Sacarose	Dextrose	Extrato de levedura	Peptona	Triptona	Farinha de milho	Extrato de malte	Agar	pH
M1	24 g/L	11 g/L						1g/L	1 g/L				20g/L	6.92
M2	50 g/L									1 g/L			20g/L	6.70
FG3	25 g/L		0.5 g/L	1 g/L	2 g/L	10g/L	10 g/L						20g/L	7.0
GPY	24 g/L						20 g/L	10 g/L	20 g/L				20g/L	
FB	24 g/L										20 g/L		20g/L	
MT	24 g/L						20 g/L		1 g/L			30 g/L	20g/L	
SBA							20 g/L	3 g/L	10 g/L				20g/L	

3.1.2.2 Produção de metabólitos

As bactérias foram inoculadas nos meios sólidos de crescimento e mantidas à temperatura ambiente por 24 h. Para preparar o pré-inóculo, os isolados cresceram nos respectivos meios líquidos durante 48 h à temperatura ambiente. A densidade ótica a 600 nm (OD_{600}) foi ajustada para 0.2 e 4 mL desta suspensão foi adicionada em 50 mL do meio de cultivo. Como controle negativo do cultivo inoculou-se 4 mL do respectivo meio líquido em 50 mL do meio de cultivo a fim de garantir ausência de efeito do meio nas atividades biológicas.

O meio de cultivo foi composto de extrato de levedura 4,5 g/L, dextrina 50 g/L, peptona 2 g/L, NaCl 24 g/L e $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ 11 g/L, com pH 5.6. Foram utilizados frascos Erlenmeyer de 250 mL, mantidos sob agitação constante durante 120 h a 150 rpm e 28 °C. Após cada 24 h, 2 mL do meio de cultivo foi coletado, as células bacterianas foram separadas por centrifugação durante 1 h, à 10000 rpm e 4 °C (Centrífuga 5804R, Eppendorf, Hamburg, Alemanha). O sobrenadante foi retirado, filtrado em membrana de poro de 0.2 µm (Minisart Sartorius Co, Göttingen, Alemanha) e congelado. Este filtrado bacteriano foi utilizado para a pesquisa de metabólitos antibiofilme e antimicrobiano.

3.1.2.3 Ensaios de bioatividade e microrganismos modelo

Realizaram-se estudos de rastreamento de atividade antibiofilme previamente formado e atividade antiformação de biofilme em placas de 96 poços estéreis de poliestireno (Costar 3595 Corning, Inc. NY, EUA), segundo o método cristal violeta (adaptado de Stepanovic, *et al.*¹⁰⁴) utilizando *S. epidermidis* ATCC 35984 e *P. aeruginosa* ATCC 27853 como bactérias modelo Gram-positiva e Gram-negativa, respectivamente, na produção de biofilmes patogênicos.

Staphylococcus epidermidis e *P. aeruginosa* foram crescidos em meio Luria-Bertani (LB) a 37 °C e 150 rpm. No ensaio antibiofilme previamente formado, 100 µL da suspensão bacteriana e 100 µL de meio LB foram adicionados nos poços e incubados a 37 °C durante 24 h para *S. epidermidis*, e durante 8 h para *P. aeruginosa*.

Para o controle negativo incubou-se 200 µL de caldo LB. O sobrenadante de todos os dos poços foram aspirados e o poços lavados três vezes com 200 µL de salina estéril para se retirar as bactérias planctônicas e permitir apenas a presença de bactérias aderentes ao plástico. Em seguida foram adicionados 100 µL do filtrado bacteriano marinho e 100 µL de meio LB, incubando-se novamente a 37 °C durante 24 h para ambas as bactérias. O controle positivo e o negativo receberam 200 µL de meio LB após a lavagem. Já no ensaio antiformação de biofilme, 100 µL da suspensão bacteriana, 50 µL de meio LB e 100 µL do filtrado bacteriano marinho foram adicionados aos poços e incubados a 37 °C durante 24 h para *S. epidermidis*, e 8 h para *P. aeruginosa*. O controle positivo recebeu 150 µL de meio LB e 100 µL de suspensão bacteriana enquanto que o controle negativo consistiu de 250 µL de meio LB.

Após o período de incubação, em ambos os protocolos, o conteúdo dos poços foi removido e lavado três vezes com 200 µL de salina estéril. As bactérias que permaneceram aderidas às placas foram fixadas pela exposição ao ar quente à 60 °C durante 1 h. O biofilme aderido foi corado com 200 µL de cristal violeta 0.4 % durante 15 minutos à temperatura ambiente. O excesso de corante foi retirado com água corrente até que a lavagem ficasse livre de coloração, então o cristal violeta foi ressolubilizado com DMSO 99.5% (Sigma, St. Louis, MO, EUA) e a absorbância a 570 nm foi medida (Spectramax M2e Multimode Microplate Reader, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, EUA).

Para rastreamento da atividade antimicrobiana, utilizou-se o método de difusão em agar, no qual 100 µL da suspensão bacteriana foi inoculado em agar Mueller Hinton com auxílio da alça de Drigalski. Em cada placa de Petri foram apoiados 3 cilindros de metal com diâmetro interno de 6 mm e carregados com 100 µL dos filtrados. As placas foram mantidas em refrigeração durante 24 h para difusão do filtrado no meio e depois incubadas a 37 °C por 24 h. A zona de inibição foi medida. Como controle do experimento utilizou-se rifampicina 16 µg/mL dissolvida em metanol 25 mg/mL para *S. epidermidis* e sulfato de gentamicina 16 µg/mL para *P. aeruginosa*.

3.1.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1.3.1 Isolamento das bactérias marinhas

Foram coletadas 39 esponjas marinhas na Ilha do Arvoredo, Santa Catarina. Destas, foram isoladas 160 bactérias, onde 78 cresceram no meio M1, 46 no meio M2, 7 no meio FG3, 17 no meio GPY, 4 no meio FB, 2 no meio MT, e 6 no meio SBA. Isolou-se um maior número de bactérias no meio M1 e M2, mostrando de certa forma uma preferência por meios de crescimento relativamente pobres, quando comparados aos meios GPY, MT, SBA. Curiosamente, houve crescimento no meio sem a presença de uma fonte de nitrogênio (FG3), possivelmente o nitrogênio foi retirado de algum traço presente no agar ou na própria suspensão da água do mar. Além disso, estas bactérias marinhas crescem com concentrações de NaCl de até 50g/L, mais que o dobro da concentração de NaCl presente em meio comercial para cultivo de bactérias marinhas¹⁰⁵.

3.1.3.2 Rastreamento da atividade antibiofilme

Para o rastreamento da atividade frente a biofilmes previamente formados e da atividade antif formação de biofilmes, considerou-se um ponto de corte de 30 % para selecionar os filtrados ativos.

Das 21 bactérias escolhidas e cultivadas durante 120 h conforme descrito anteriormente, para a atividade de combate de biofilmes já formados, observa-se que os filtrados das bactérias 203, 209, 210, 256 e 267 foram capazes de combater o biofilme já formado de *P. aeruginosa* em, $40,3 \pm 17,4$ %, $34,2 \pm 15,5$ %, $40,0 \pm 4,8$ %, $55,9 \pm 23,6$ % e $44,9 \pm 15,3$ %, respectivamente (Figura 3.1.2), enquanto que o filtrado 209 foi o que apresentou melhor atividade frente ao biofilme já formado de *S. epidermidis*, sendo capaz de combatê-lo em $47,2 \pm 29,6$ % (Figura 3.1.3).

O controle negativo do cultivo foi utilizado em todos os experimentos a fim de garantir a ausência de efeito do meio nas atividades biológicas.

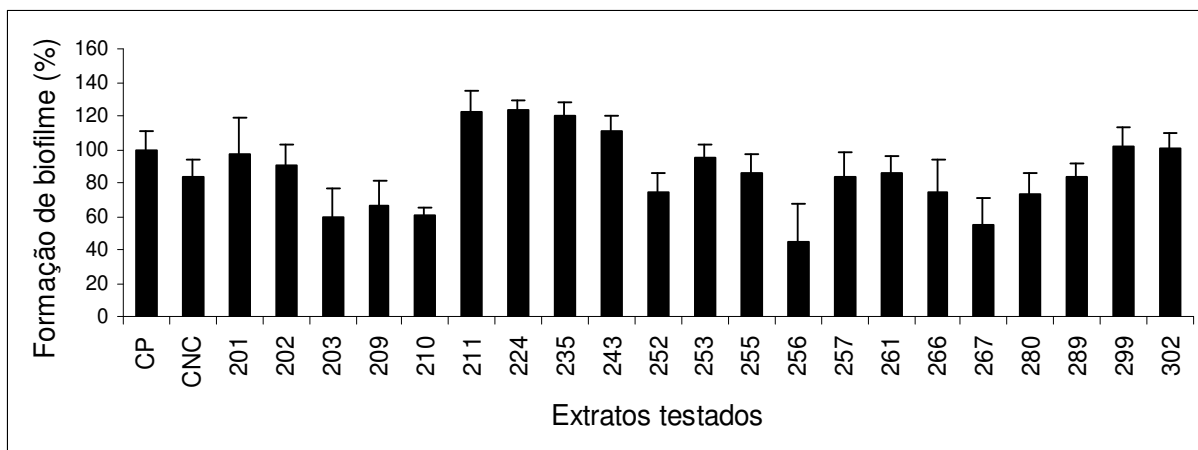


Figura 3.1.2: Rastreamento de atividade antibiofilme já formado de *P. aeruginosa* ATCC27853. CP representa o controle positivo e CNC o controle negativo do cultivo. Resultados representam média percentual da formação de biofilme em relação ao controle positivo (n=1, 6 poços).

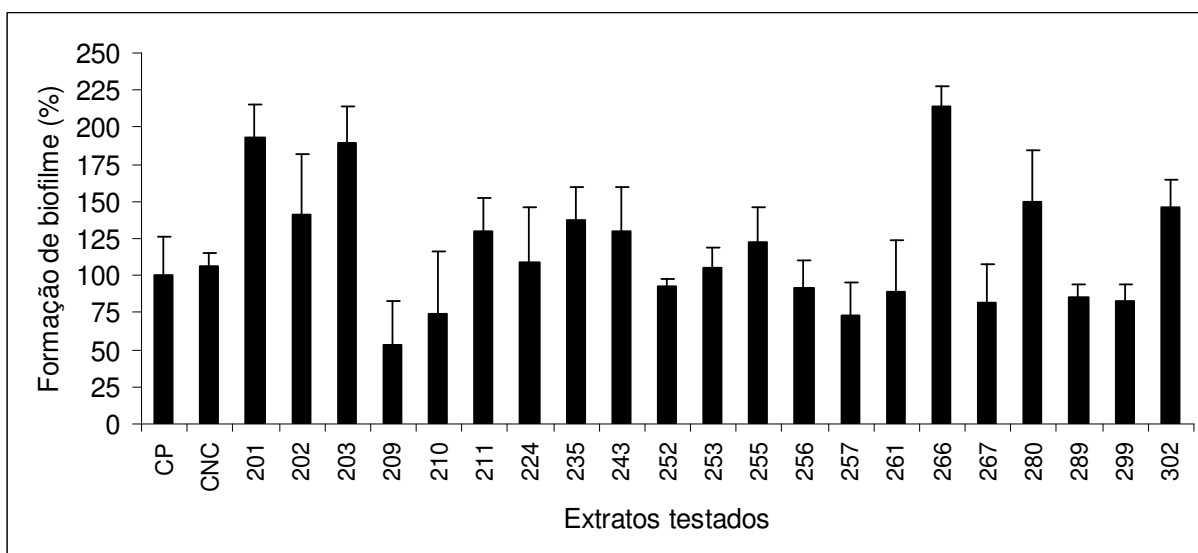


Figura 3.1.3: Rastreamento de atividade antibiofilme já formado de *S. epidermidis* ATCC35984. CP representa o controle positivo e CNC o controle negativo do cultivo. Resultados representam média percentual da formação de biofilme em relação ao controle positivo (n=1, 6 poços).

O rastreamento de atividade antif formação de biofilme foi realizado utilizando um número menor de filtrados, dentre eles, alguns que apresentaram maior atividade contra biofilme já formado.

Os filtrados 202, 203, 211, 224, 256 e 280 apresentaram redução na formação de biofilme de *P. aeruginosa*, com atividades de $49,2 \pm 14,3 \%$, $61,2 \pm 22,4 \%$, $46,9 \pm 13,5 \%$, $43,2 \pm 13,2 \%$, $40,7 \pm 20,4 \%$, e $40,3 \pm 31,9 \%$, respectivamente (Figura 3.1.4). Entretanto, o filtrado 224 foi o único entre os filtrados testados que apresentou

atividade antiformação de biofilme de *S. epidermidis*, sendo capaz de inibir em $63.84 \pm 10.13\%$, a maior atividade encontrada no rastreamento (Figura 3.1.5).

O sobrenadante da bactéria 224, associada à esponja marinha *Darwinella* sp., apresentou importante atividade antiformação de biofilme *S. epidermidis*. Assim, o estudo passou a ser focalizado na produção de metabólito(s) ativo(s) contra biofilme de *S. epidermidis* por este isolado.

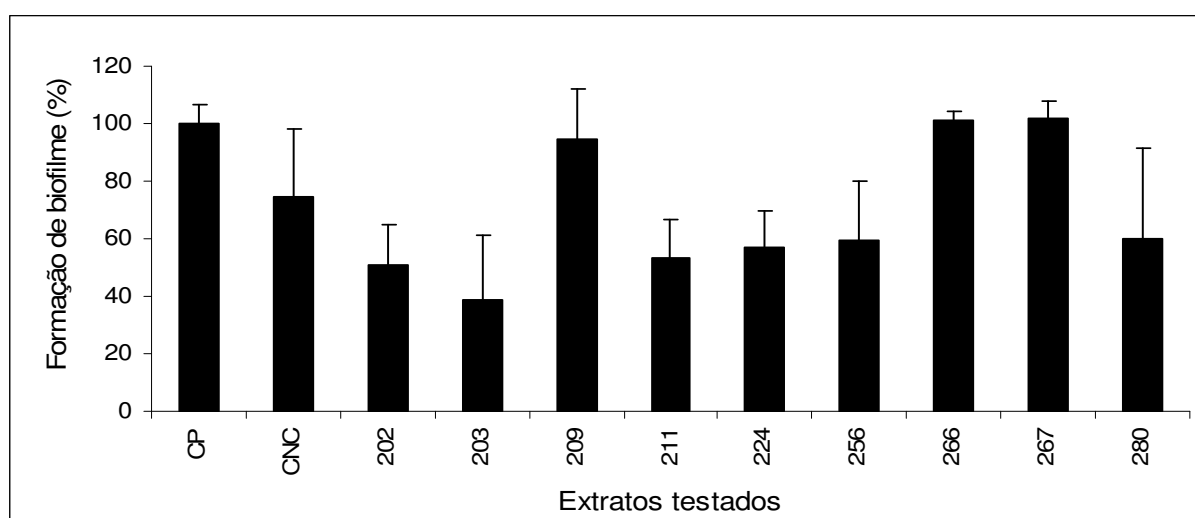


Figura 3.1.4: Rastreamento de atividade antiformação de biofilme de *P. aeruginosa* ATCC27853. CP representa o controle positivo e CNC o controle negativo do cultivo. Resultados representam média percentual da formação de biofilme em relação ao controle positivo (n=1, 6 poços).



Figura 3.1.5: Rastreamento de atividade antiformação de biofilme de *S. epidermidis* ATCC35984. CP representa o controle positivo e CNC o controle negativo do cultivo. Resultados representam média percentual da formação de biofilme em relação ao controle positivo (n=1, 6 poços).

3.1.3.3 Otimização de alguns parâmetros da atividade antibiofilme o filtrado 224

Neste sentido, se buscou otimizar alguns parâmetros do ensaio, realizando experimentos para avaliar a atividade antiformação de biofilme do filtrado 224 conforme a concentração do inóculo de *S. epidermidis*, e o tempo ideal de cultivo da bactéria 224 para obtenção da maior produção de metabólito ativo. Foi possível verificar que a atividade antiformação de biofilme do filtrado 224 varia pouco conforme a concentração do inóculo de *S. epidermidis*, entretanto há uma tendência de apresentar maior atividade quanto maior o inóculo (Figura 3.1.6). A densidade óptica medida a 600 nm de 0,30 foi selecionada como inóculo padrão para os ensaios posteriores, a qual equivale à escala 0.5 Mc Farland (10^8 UFC/mL).

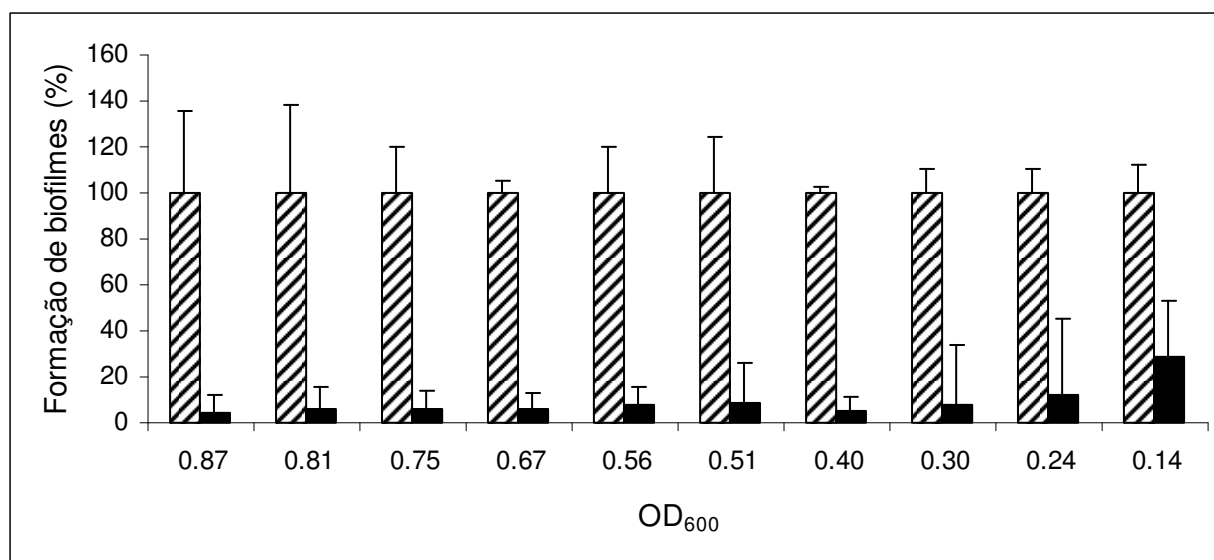


Figura 3.1.6: Influência da concentração de inóculo de *S. epidermidis* (OD₆₀₀: 0.14 a 0.87) na atividade antiformação de biofilme do filtrado 224. Barras listradas representam controle positivo de cada inóculo, enquanto que as barras pretas representam biofilmes tratados com o filtrado 224 em cada inóculo.

Verificou-se que a produção do(s) metabólito(s) com atividade antibiofilme é tempo-dependente, não havendo consumo ou degradação das moléculas nos tempos ensaiados. A atividade antiformação de biofilme de *S. epidermidis* varia de $16,9 \pm 8,5$ % após 24 h a $83,7 \pm 12,9$ % após 120 h de cultivo (Figura 3.1.7). Selecionou-se o tempo de 96 h como tempo de cultivo padrão para a produção do

filtrado 224 para ser utilizado nos demais experimentos, cuja atividade antiformação de biofilme foi de $88,3 \pm 9,6 \%$, a mais elevada (Figura 3.1.7).

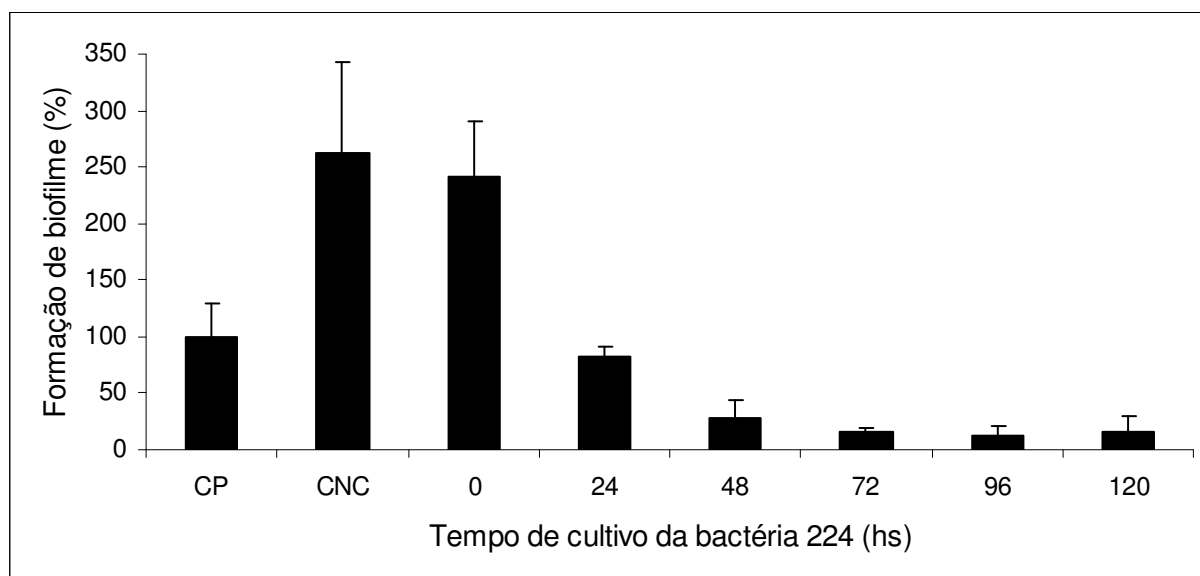


Figura 3.1.7: Influência do tempo de cultivo da bactéria 224 na produção de metabólito(s) capaz(es) de inibir a formação de biofilme de *S. epidermidis*. CP representa o controle positivo e CNC o controle negativo do cultivo.

3.1.3.4 Atividade antimicrobiana

Com relação ao rastreamento da atividade antimicrobiana, nenhum dos 21 filtrados bacterianos apresentou halo de inibição frente à *S. epidermidis* ATCC35984 e à *P. aeruginosa* ATCC27853 através da avaliação pelo método dos cilindros, sugerindo que os filtrados que apresentaram atividade antibiofilme no rastreamento possivelmente agem por outro mecanismo que não a inibição do crescimento bacteriano, observação que vai ao encontro das nossas expectativas, na busca de composto não-antimicrobianos com atividade antibiofilme.

Os resultados preliminares obtidos nesta fase de rastreamento mostraram o potencial das bactérias marinhas como fonte de moléculas bioativas, merecendo destaque a atividade antibiofilme e focalizaram este trabalho no estudo da atividade antiformação de biofilme de *S. epidermidis* pelo filtrado produzido pela bactéria marinha associada à esponja *Darwinella* sp.

4. DISCUSSÃO GERAL

Os ensaios preliminares desenvolvidos na etapa de rastreamento de atividade antibiofilme mostram o grande potencial exibido pelas bactérias associadas a esponjas marinhas como fontes de moléculas bioativas. A técnica do cristal violeta, atualmente a mais utilizada pelos laboratórios de pesquisa para a detecção de biofilmes, mostrou-se efetiva para a avaliação da atividade antibiofilme. Das 21 bactérias selecionadas ao acaso para cultivo, 8 (38.0 %) apresentaram alguma atividade antibiofilme, seja impedindo a formação de biofilme bem como combatendo biofilmes já formados, de *S. epidermidis* ATCC 35984 e/ou de *P. aeruginosa* ATCC 27853. A maior parte dos filtrados apresentou ação sobre biofilmes de *P. aeruginosa*, onde 5 (23.8 %) foram ativos contra biofilmes previamente formados e 6 (28.6 %) foram capazes de impedir a formação dos biofilmes. Com relação ao *S. epidermidis*, apenas 1 filtrado foi capaz de combater biofilmes previamente formados e também 1 foi capaz de impedir a formação dos mesmos.

De maneira interessante, dos 21 filtrados bacterianos marinhos obtidos, nenhum apresentou atividade antimicrobiana quando testados através da técnica dos cilindros, contra *S. epidermidis* ATCC 35984 e *P. aeruginosa* ATCC 27853. Este resultado é, de certa forma, bastante desejado, uma vez que o projeto visa buscar moléculas antibiofilme não antimicrobiana capazes de combater bactérias formadoras de biofilmes através de um novo mecanismo de ação, a fim de evitar o rápido desenvolvimento de resistência bacteriana, como ocorre com os antimicrobianos.

A descoberta e produção sustentada de compostos de origem microbiana marinha são freqüentemente dificultadas pelo acesso limitado aos genes de biossíntese de alguns produtos, uma vez que as bactérias e os fungos abrigam um número massivo de genes que permanecem dormentes sob as condições padrões de laboratório, conservando-se silenciados na ausência de um estímulo particular, como fontes de nutrientes, estímulos ambientais, compostos de sinalização ou outros desencadeantes ainda desconhecidos. Recentes estudos fornecem novas abordagens, como o uso da

metagenômica para buscar a expressão de genes silenciados. Desta maneira, o verdadeiro potencial biossintético dos microrganismos, principalmente marinhos, permanece por ser determinado¹⁰⁶. Por outro lado, este rastreamento evidencia o grande potencial dos microrganismos como fonte de moléculas bioativas, visto que foram utilizados apenas 13.2 % dos isolados bacterianos da coleção de bactérias associadas às esponjas geradas neste estudo, dos quais 38 % apresentaram habilidade para combater biofilmes bacterianos. Assim, a diversidade química inexplorada destes microrganismos representa um vasto campo ainda um pouco obscuro, porém valioso para busca de novas moléculas com atividades farmacológicas e mecanismos de ação inovadores, principalmente no contexto de doenças cancerígenas e infecciosas.

Neste trabalho, relatamos a produção de metabólito(s) com importante atividade antif formação de biofilme de *S. epidermidis*, sem ação antimicrobiana, a partir de uma bactéria Gram-negativa associada à esponja marinha *Darwinella* sp. *Staphylococcus epidermidis* são conhecidos por serem importantes colonizadores de implantes médicos, apresentando como principal fator de virulência a habilidade de se aderir a superfícies e formar biofilmes difíceis de tratar⁶². Este filtrado foi testado contra 13 *S. epidermidis* formadores de biofilme isolados de cateter venoso, apresentando redução significativa da formação de biofilme em 10 amostras, sendo capaz de inibir em até 90.21 ± 1.61 % a formação de biofilme (isolado 113).

Na busca por alguma associação entre a atividade antif formação de biofilme do filtrado 224 com o perfil de suscetibilidade dos isolados clínicos de cateter venoso central, observou-se que, de maneira geral, nos isolados suscetíveis à clindamicina, gentamicina e rifampicina, o filtrado 224 pareceu ser mais ativo. Esta relação possui importância, no caso futuro de se pensar que em isolados de *S. epidermidis* suscetíveis a estes antimicrobianos pode-se fazer uso das moléculas presentes neste filtrado para impedir a formação de biofilme.

Imagens de microscopia eletrônica de varredura mostram que biofilmes tratados com o filtrado 224 formam menor número de agregados, os quais possuem menor número de células bacterianas. Entretanto, o que chama a atenção é que os poucos

grupos de células presentes não aparecem envoltos pela matriz exopolissacarídica protetora (EPS), a qual é capaz de tornar a adesão bacteriana ao substrato irreversível e pode conferir resistência aos agentes antimicrobianos e à ação do sistema imune. Alguns estudos demonstram que a produção do EPS é regulada via QS, parecendo haver uma conexão entre a densidade celular e a produção de EPS^{107,108}. Desta maneira, pode-se sugerir que o(s) metabólito(s) presentes no filtrado 224 sejam capazes de modular o sistema QS de *S. epidermidis*, e assim impedir a produção de EPS, evitando a adesão irreversível ao material e a conseqüente formação de biofilmes. Além disso, os resultados encontrados indicam que o filtrado 224 deve manter as células em estado planctônico, uma vez que não possui atividade antimicrobiana, podendo desta maneira tornar às células bacterianas mais suscetíveis aos antimicrobianos tradicionais.

A atividade encontrada pelo filtrado 224 representa um exemplo do conceito mais inovador de terapia antimicrobiana: as moléculas antivirulência. Nesta abordagem alternativa, o objetivo é atingir funções essenciais para o estabelecimento de uma infecção, como fatores de virulência necessários para causar dano ao hospedeiro e doença. Esta estratégia possui diversas vantagens potenciais incluindo o grande número de funções que podem ser inibidas, a preservação da microbiota normal humana e, como principal benefício, exerce menor pressão seletiva, podendo resultar na diminuição da resistência¹⁰⁹.

Na busca da purificação parcial do filtrado 224, ativo contra a formação de biofilmes de *S. epidermidis*, foi detectada a atividade antimicrobiana da fração água de diálise da amostra 224 contra o *C. violaceum* DSM 30191. A análise cromatográfica através de HPLC-MS-MS e a espectrofotométrica através de infravermelho indicam a presença do ácido pimélico na amostra.

Interessantemente, apesar de a literatura ser bastante escassa e antiga, alguns trabalhos mostram que derivados do ácido pimélico possuem atividade antimicrobiana contra *Mycobacterium tuberculosis***Erro! Indicador não definido.****Erro! Indicador não definido.**, enquanto outros demonstram que o ácido pimélico é um fator de

crescimento bacteriano podendo servir como precursor para síntese de biotina e assim estimular o crescimento bacteriano. **Erro! Indicador não definido. Erro! Indicador não definido. Erro! Indicador não definido.**, o que pode explicar o estímulo no crescimento de *S. epidermidis* e *P. aeruginosa*. Mais recentemente, a literatura, destaca a atividade antimicrobiana por derivados do ácido aminopimélico, os quais são capazes de inibir o crescimento bacteriano de Gram-negativos via inibição da biossíntese do ácido diaminopimélico (DAP), um componente do peptidoglicano da parede celular de quase todas as bactérias^{110,111}.

O *C. violaceum* parece bastante sensível a pequenas alterações laboratoriais e, além disso, a atividade antimicrobiana encontrada foi apenas contra este microrganismo, sendo altamente seletiva. Assim, estão sendo elaborados experimentos visando avaliar se o ácido pimélico é realmente o composto responsável pela atividade antimicrobiana contra *C. violaceum*, bem como a aquisição do ácido pimélico está sendo providenciada a fim de confirmar os resultados obtidos.

Por fim, a purificação e elucidação estrutural do(s) composto(s) envolvidos na atividade de biofilme de *S. epidermidis* exercida pelo filtrado bacteriano 224 encontram-se em andamento. A partir de então, poderá ser desenvolvido um estudo mais aprofundado com relação ao tipo de molécula presente, permitindo um melhor entendimento sobre o seu mecanismo de ação e alguma predição quanto ao surgimento de resistência. Poderão ainda ser avaliadas possíveis modulações na expressão gênica do *S. epidermidis* bem como as doses necessárias para se obter o efeito desejado.

A atividade antiformação de biofilme de *S. epidermidis* possui grande aplicabilidade no recobrimento de superfícies de interesse médico, como cateteres e próteses. Com o aumento do número de dispositivos médicos sendo utilizados e a altas taxas de infecção associadas ao uso dos mesmos¹¹², em 2002 o CDC¹¹³ recomendou o uso de cateteres recobertos com antimicrobianos nas populações onde a taxa de infecção exceda 3.3/1000 cateteres por dia. Neste sentido, o recobrimento destas superfícies com moléculas capazes de inibir a formação de biofilmes e não exercer pressão seletiva para o desenvolvimento de resistência bacteriana representa uma

estratégia fundamental e de extrema necessidade, contribuindo a longo prazo para o combate à problemas de saúde pública, como o custo e o tempo de internação nos hospitais e a morbi-mortalidade associada à infecções bacterianas relacionadas à formação de biofilmes.

5. CONCLUSÕES

De maneira geral, esta dissertação evidenciou:

- O grande potencial das bactérias associadas às esponjas marinhas como fonte de metabólitos com atividade antibiofilme bacteriano.
- A atividade antimicrobiana contra *C. violaceum* apresentada por um cocobacilo Gram-negativo associado à esponja *Darwinella* sp., destacando a possibilidade de se utilizar o ácido pimélico como agente antimicrobiano bastante seletivo contra o *C. violaceum*, embora seja necessária a confirmação através de outros ensaios.
- A atividade antiformação de biofilme de *S. epidermidis* apresentada pelo mesmo cocobacilo Gram-negativo associado à esponja *Darwinella* sp.

Esta atividade encontrada é extremamente alta considerando que os ensaios realizados utilizaram o filtrado do cultivo bacteriano, e interessantemente não está associada à morte celular bacteriana, sugerindo um novo mecanismo de ação a ser explorado.

A grande aplicabilidade da atividade antiformação de biofilme de *S. epidermidis* seria o recobrimento de materiais médico-hospitalares, destacando-se próteses, cateteres urinários e venosos, bem como equipamentos para circulação extracorpórea. Outra aplicação seria a administração de moléculas antibiofilme concomitantemente aos antimicrobianos nos casos de infecção bacteriana associadas à formação de biofilmes. O uso de moléculas antibiofilme como adjuvante na terapia tornaria o microrganismo menos virulento e mais susceptível à ação de antimicrobianos, facilitando o tratamento. Estes exemplos representam uma nova abordagem para prevenção e para o tratamento de infecções associadas à formação de biofilmes bacterianos, as quais comumente envolvem o uso de biomateriais.

6. PERSPECTIVAS

Como perspectivas deste trabalho:

- Fracionamento do filtrado 224;
- Isolamento e elucidação da(s) molécula(s) envolvidas com a atividade antibiofilme;
- Confirmação da atividade antibacteriana do ácido pimélico frente ao *C. violaceum*;

7. REFERÊNCIAS

-
- ¹ PINTO, A.C.; SILVA, D.H.S.; BOLZANI, V.S.; LOPES, N.P., EPIFANIO, R.A. Produtos naturais: atualidades, desafios e perspectivas. **Química Nova**, v.25, p. 45-61, 2002.
- ² KELECOM, A. 2002. Secondary metabolites from marine microorganisms. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v.71, p. 151-170, 2002.
- ³ BLUNT, J.W.; COPP, B.R.; HU, W.P.; MUNRO, M.H.; NORTHCOTE, P.T.; PRINSEP, M.R. Marine natural products. **Natural Products Reports**, v.26, p. 170-244, 2009.
- ⁴ KELECOM, A. Chemistry of natural products: yesterday, today and tomorrow. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v.71, p. 249-263, 1999.
- ⁵ MONTHES, B.; LERNER, C.; DA SILVA, C.M.M. **Guia ilustrado: Esponjas marinhas da costa sul brasileira**. Pelotas: Ed. USEB, 2. ed, 2006. 119p.
- ⁶ BRUSCA, R.C.; E BRUSCA, G.J. Filo Porífera: As esponjas. In: BRUSCA, R.C.; E BRUSCA, G.J. **Invertebrados**. 2ºed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2007, cap.6, p.185-216.
- ⁷ PAULINO, W.R. **Biologia Atual. Seres vivos e fisiologia**. São Paulo: Ed Ática. v.2, 1997. 439p.
- ⁸ VOGEL, G. The inner lives of sponges. **Science**, v.320, p. 1028-1030, 2008.
- ⁹ TAYLOR, M.W.; RADAX, R.; STEGER, D., WAGNER, M. Sponge-associated microorganisms: Evaluation, ecology, e biotechnological potential. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 71, p. 295-347, 2007.
- ¹⁰ BLUNT, J.W.; COPP, B.R.; HU, W.; MUNRO, M.H.G.; NORTHCOTE, P.T.; PRINSEP, M.R. Marine natural products. **Natural Products Reports**, v. 25, p. 35-94, 2008.
- ¹¹ HUNG, D. T.; JAMISON, T. F.; SCHREIBER, S. L. Understanding and controlling the cell cycle with natural products. **Chemistry and Biology**, v. 3, p. 623-639, 1996.
- ¹² DAVIDSON, S.K.; ALLEN, S.W.; LIM, G.E.; ANDERSON, C.M.; HAYGOOD, M.G. Evidence for the biosynthesis of bryostatins by the bacterial symbiont “*Candidatus Endobugula sertula*” of the bryozoan *Bugula neritina*. **Applied Environmental Microbiology**, v. 67, p. 4531-4537, 2001.
- ¹³ THAKUR, A., THAKUR, N; INDAP, M.M.; PANDIT, R.A.; DATAR, V.V.; MÜLLER, W.E.G. Antiangiogenic, antimicrobial, and cytotoxic potential of sponge-associated bacteria. **Marine Biotechnology**, v. 7, p. 245-252, 2005.

-
- ¹⁴ MUSCHOLL-SILBERHORN, A.; THIEL, V.; IMHOFF, J.F. Abundance and bioactivity of cultured sponge-associated bacteria from the Mediterranean sea. **Microbial Ecology**, v. 55, p. 94-106, 2008.
- ¹⁵ COSTERTON, J.W.; GEESEY, G.G.; CHENG, K.J.. How bacteria stick. **Scientific American**, v. 238, p.86-95, 1978.
- ¹⁶ COSTERTON, J.W.; CHENG, K.J.; GEESEY, G.G.; LADD, T.I.; NICKEL, J.C.; DASGUPTA, M.; MARRIE, T.J. Bacterial biofilms in nature and disease. **Annual Review of Microbiology**, v. 41, p. 435-464, 1987.
- ¹⁷ DAVEY, M.E.; O'TOOLE, G.A. 2000. Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 64, p. 847-867, 2000.
- ¹⁸ SOO, R.M.; WOOD, S.A.; GRZYMSKI, J.J.; MCDONALD, I.R.; CARY, S.C. Microbial biodiversity of thermophilic communities in hot mineral soils of Tramway Ridge, Mount Erebus, Antarctica. **Environmental Microbiology**, v.11, p. 715-728, 2009.
- ¹⁹ MACEDO, A.J.; TIMMIS, K.N.; ABRAHAM, W.R. Widespread capacity to metabolize polychlorinated biphenyls by diverse microbial communities in soils with no significant exposure to PCB contamination. **Environmental Microbiology**, v. 9, p. 1890-1897, 2007.
- ²⁰ DAVIES, D. Understanding biofilm resistance to antimicrobial agents. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 2, p. 114-122, 2003.
- ²¹ STOODLEY, P.; SAUER, K.; DAVIES, D.G.; COSTERTON, J.W. Biofilms as complex differentiated communities. **Annual Review of Microbiology**, v 56, p. 187-209, 2002.
- ²² DAVIES, D.G; PARSEK, M.R.; PEARSON, J.P.; IGLEWSKI, B.H.; COSTERTON, J.W.; GREENBERG, E.P. The involvement of cell-to-cell signals in the development of a bacterial biofilm. **Science**. v. 280, p. 295-298, 1998.
- ²³ GONZÁLEZ, J.E.; KESHAVAN, N.D. Messing With Bacterial Quorum Sensing. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 70, p. 859-875, 2006.
- ²⁴ WATERS, C.M.; BASSLER, B.L. Quorum sensing: cell-to-cell communication in bacteria. **Annual Review of Cell and Development Biology**, v. 21, p. 319–346, 2005.
- ²⁵ FUQUA, C. E GREENBERG, E.P. Self perception in bacteria: quorum sensing with acylated homoserine lactones. **Current Opinion in Microbiology**, v. 2, p. 183-189, 1999.

-
- ²⁶ NOVICK, R.P. Regulation of pathogenicity in *Staphylococcus aureus* by a peptide-based-density-sensing system. In: DUNNY, G.M. AND WINANS, S.C. **Cell-cell signaling in bacteria**. Washington: ASM Press, 1999, p. 175-192.
- ²⁷ CHEN, X.; SCHAUDER, S.; POTIER, N.; VAN DORSSELAER, A.; PELCZER, I.; BASSLER, B.L.; HUGHSON, F.M. Structural identification of a bacterial quorum-sensing signal containing boron. **Nature**, v. 415: p. 545-549, 2002.
- ²⁸ RYAN, R.P.; DOW, J.M. Diffusible signals and interspecies communication in bacteria. **Microbiology**, v. 154, p. 1845-1858, 2008.
- ²⁹ MAYVILLE, P.; JI, G.; BEAVIS, R.; YANG, H.; GOGER, M. NOVICK, R.P.; MUIR, T.W. Structure-activity analysis of synthetic autoinducing thiolactone peptides from *Staphylococcus aureus* responsible for virulence. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 96, p. 1218–1223, 1999.
- ³⁰ READING, N.C. E SPERANDIO, V. Quorum sensing: the many languages of bacteria. **FEMS Microbiology. Letters**. v. 254, p. 1-11, 2006.
- ³¹ HENTZER. M.; WU, H.; ANDERSEN, J.B.; RIEDEL, K.; RASMUSSEN, T.B.; BAGGE, N.; KUMAR, N.; SCHEMBRI, M.A.; SONG, Z.; KRISTOFFERSEN, P.; MANEFIELD, M.; COSTERTON, J.W.; MOLIN, S.; EBERL, L.; STEINBERG, P; KJELLEBERG, S.; HØIBY, N.; GIVSKOV, M. Attenuation of *Pseudomonas aeruginosa* virulence by quorum sensing inhibitors. **EMBO Journal**, v. 22, p. 3803-3815, 2003.
- ³² MARKETON, M. M.; GLENN, S.A.; EBERHARD, A.; GONZÁLEZ, J.E. 2003. Quorum sensing controls exopolysaccharide production in *Sinorhizobium meliloti*. **Journal of Bacteriology**, v. 185, p. 325–331, 2003.
- ³³ OHTANI, K.; HAYASHI, H.; SHIMIZU, T. The *luxS* gene is involved in cell-cell signalling for toxin production in *Clostridium perfringens*. **Molecular. Microbiology**, v. 44, p. 171–179, 2002.
- ³⁴ RICE, S. A.; KOH,K.S.; QUECK, S.Y.; LABBATE, M.; LAM, K.W. KJELLEBERG, S. Biofilm formation and sloughing in *Serratia marcescens* are controlled by quorum sensing and nutrient cues. **Journal of Bacteriology**, v. 187, p. 3477– 3485, 2005.
- ³⁵ QUINONES, B.; DULLA, G.; LINDOW, S.E. Quorum sensing regulates exopolysaccharide production, motility, and virulence in *Pseudomonas syringae*. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 18, p. 682–693, 2005.
- ³⁶ COSTERTON, J.W.; STEWART, P.S.; GREENBERG, E.P. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections **Science**, v. 284, p. 1318-1322, 1999.

-
- ³⁷ NICHOLS, W.W.; DORRINGTON, S.M.; SLACK, M.P.; WALMSLEY, H.L. Inhibition of tobramycin diffusion by binding to alginate. **Antimicrobial. Agents and Chemotherapy**, v. 32, p. 518-523, 1988.
- ³⁸ MAH, T.F. E O'TOOLE, G.A. Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. **Trends in Microbiology**, v. 9, p. 34-39, 2001.
- ³⁹ WALTERS, M.C.; ROE, F.; BUGNICOURT, A.; FRANKLIN, M.J.; STEWART, P.S. Contributions of antibiotic penetration, oxygen limitation, and low metabolic activity to tolerance of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms to ciprofloxacin and tobramycin. **Antimicrobial. Agents and Chemotherapy**, v. 47, p. 317-323, 2003.
- ⁴⁰ DONLAN, R.M. E COSTERTON, J.W. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 15, p.167-193, 2002.
- ⁴¹ WHO – World Health Organization. Global strategy for containment of antimicrobial resistance. Anti-infective drug resistance surveillance and containment. Disponível em <http://www.who.int/emc/amr.html>. Acesso em: 30 set. 2007.
- ⁴² DRENKARD, E. Antimicrobial resistance of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. **Microbes and Infections**, v. 5, p. 1213-1219, 2003.
- ⁴³ CEGELSKI, L.; MARSHALL, G.R.; ELDRIDGE, G.R.; HULTGREN, S.J. The biology and future prospects of antivirulence therapies. **Nature Reviews Microbiology**, v. 6, p. 17-27, 2008.
- ⁴⁴ ESCAICH, S. A new therapeutic approach for the treatment of severe infections. **Drug Plus International**, v. 5, p. 6-7, 2006.
- ⁴⁵ HENTZER, M.; GIVSKOV, M.. Pharmacological inhibition of quorum sensing for the treatment of chronic bacterial infections. **Journal of Clinical Investigation.**, v. 12, p. 1300-1307, 2003.
- ⁴⁶ RASMUSSEN, T.B.; GIVSKOV, M. Quorum sensing inhibitors: a bargain of effects. **Microbiology**, v. 152, p. 895-904, 2006.
- ⁴⁷ ESCAICH, S. Antivirulence as a new antibacterial approach for chemotherapy. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 12, p. 400-408, 2008.
- ⁴⁸ GIVSKOV, M.; DE NYS, R.; MANEFIELD, M.; GRAM, L.; MAXIMILIEN, R.; EBERL, L.; MOLIN, S.; STEINBERG, P.D.; KJELLEBERG, S. Eukaryotic interference with homoserine lactone-mediated prokaryotic signalling. **Journal of Bacteriology**, v. 178, p. 6618-6622, 1996.
- ⁴⁹ TEPLITSKI, M.; CHEN, H.; RAJAMANI, S.; GAO, M.; MERIGHI, M.; SAYRE, R.T.; ROBINSON, J.B.; ROLFE, B.G.; BAUER, W.D. *Chlamydomonas reinhardtii* secretes compounds that mimic bacterial signals and interfere with quorum sensing regulation in bacteria. **Plant Physiology**, v. 134, p. 137-146, 2004.

-
- ⁵⁰ HUIGENS, R.W.; MA, L.; GAMBINO, C.; MOELLER, P.D.; BASSO, A.; CAVANAGH, J.; WOZNIAK, D.J.; MELANDER, C. Control of bacterial biofilms with marine alkaloid derivatives. **Molecular BioSystems**, v. 4, p. 614-621, 2008.
- ⁵¹ SKINDERSOE, M.E.; ETTINGER-EPSTEIN, P.; RASMUSSEN, T.B.; BJARNSHOLT, T.; DE NYS, R.; GIVSKOV, M. Quorum sensing antagonism from marine organisms. **Marine Biotechnology**, v. 10, p. 56-63, 2008.
- ⁵² MANEFIELD, M.; RASMUSSEN, T.B.; HENZTER, M.; ANDERSEN, J.B.; STEINBERG, P.; KJELLEBERG, S.; GIVSKOV, M. Halogenated furanones inhibit quorum sensing through accelerated LuxR turnover. **Microbiology**, v. 148, p. 1119-1127, 2002.
- ⁵³ 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.
- ⁵⁴ 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.
- ⁵⁵ ABERG, V.; SELLSTEDT, M.; HEDENSTROM, M.; PINKNER, J.S.; HULTGREN, S.J.; ALMQVIST, F. Design, synthetics and evaluation of peptidomimetics based on substituted bicyclic 2-pyridonetargeting virulence of uropathogenic *E. coli*. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 14, p. 7563-7581, 2006.
- ⁵⁶ 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.
- ⁵⁷ BOLES, B.R.; HORSWILL, A.R. Agr-mediated dispersal of *Staphylococcus aureus* biofilms. **PLoS Pathogens**, v. 4, n.e1000052, 2008.
- ⁵⁸ BANNERMAN, T.L. E 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.
- ⁵⁹ KARLOWSKY, J.A.; JONES, M.E.; DRAGHI, D.C.; THORNSBERRY, C.; SAHM, D.F.; VOLTURO, G.A. 2004. Prevalence and antimicrobial susceptibilities of bacteria isolated from blood cultures of hospitalized patients in the United States in 2002. **Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials**, v. 3, 7p.
- ⁶⁰ PFALLER, M.A.; HERWALDT, L.A. Laboratory, clinical and epidemiological aspects of coagulase –negative staphylococci. **Clinical Microbiology**, v. 41, p. 281-299, 1988.

-
- ⁶¹ O'GARA, J.P.; HUMPHREYS, H. *Staphylococcus epidermidis* biofilms: importance and implications. **Journal of Medical Microbiology**, v. 50, p. 582-587, 2001.
- ⁶² OTTO, M. *Staphylococcus epidermidis* - the 'accidental' pathogen. **Nature Reviews Microbiology**, v. 7, p. 555-567, 2009.
- ⁶³ YAO, Y.; STURDEVANT, D. E.; OTTO, M. Genomewide analysis of gene expression in *Staphylococcus epidermidis* biofilms: insights into the pathophysiology of *S. epidermidis* biofilms and the role of phenol-soluble modulins in formation of biofilms. **Journal of Infectious Diseases**, v. 191, p. 289–298, 2005.
- ⁶⁴ DIEKEMA, D. J.; PFALLER, M.A.; SCHMITZ, F.J.; SMAYEVSKY, J.; BELL, J.; JONES, R.N.; BEACH, M. Survey of infections due to *Staphylococcus* species: frequency of occurrence and antimicrobial susceptibility of isolates collected in the United States, Canada, Latin America, Europe, and the Western Pacific region for the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program, 1997–1999. **Clinical Infectious Diseases**, v. 32, S114–S132, 2001.
- ⁶⁵ LAVERDIERE, M.; WEISS, K.; RIVEST, R.; DELORME, J. Trends in antibiotic resistance of staphylococci over an eight-year period: differences in the emergence of resistance between coagulase positive and coagulase-negative staphylococci. **Microbial Drug Resistance**, v. 4, p. 119-122, 1998.
- ⁶⁶ RAAD, I.; HANNA, H.; MAKI, D. Intravascular catheter related infections: advances in diagnosis, prevention, and management. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 7, p. 645–657, 2007.
- ⁶⁷ BAE IG, FEDERSPIEL JJ, MIRÓ JM, WOODS CW, PARK L, RYBAK MJ, RUDE TH, BRADLEY S, BUKOVSKI S, DE LA MARIA CG, KANJ SS, KORMAN TM, MARCO F, MURDOCH DR, PLESIAT P, RODRIGUEZ-CREIXEMS M, REINBOTT P, STEED L, TATTEVIN P, TRIPODI MF, NEWTON KL, COREY GR, FOWLER VG. Heterogeneous vancomycin- intermediate susceptibility phenotype in bloodstream methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from an international cohort of patients with infective endocarditis: prevalence, genotype, and clinical significance. **The journal of infectious disease**, v.200, p.1355-1366, 2009.
- ⁶⁸ WEIGEL, L.M.; DONLAN, R.M.; SHIN, D.H.; JENSEN, B.; CLARK, N.C.; MCDUGAL, L.K.; ZHU, W.; MUSSER, K.A.; THOMPSON, J.; KOHLERSCHMIDT, D.; DUMAS, N.; LIMBERGER, R.J.; PATEL, J.B. High-level vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates associated with a polymicrobial biofilm. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 51, p. 231-238, 2007.
- ⁶⁹ RAAD, I.; HANNA, H.; JIANG, Y.; DVORAK, T.; REITZEL, R.; CHAIBAN, G.; SHERERTZ, R.; HACHEM, R. Comparative activities of daptomycin, linezolid, and tigecycline against catheter-related methicillin-resistant *Staphylococcus* bacteremic isolates embedded in biofilm. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 51, p. 1656–1660, 2007.

-
- ⁷⁰ 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.
- ⁷¹ RATJEN, F.; DORING, G. Cystic fibrosis. **The Lancet**, v. 361, p. 681-689, 2003.
- ⁷² RAN, H.; HASSETT, D.J.; LAU, G.W. Human targets of *Pseudomonas aeruginosa* pyocyanin. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 100, p. 14315-14320, 2003.
- ⁷³ HASSAN, H.M.; FRIDOVICH, I. Mechanism of the antibiotic action pyocyanine. **Journal of Bacteriology**, v. 141, p.156-163, 1980.
- ⁷⁴ LAU, G.W.; RAN, H.; KONG, F.; HASSETT, D.J.; MAVRODI, D. *Pseudomonas aeruginosa* pyocyanin is critical for lung infection in mice. **Infection and Immunity**, v. 72, p. 4275-4278, 2004.
- ⁷⁵ HASSETT, D.J.; LIMBACH, P.A.; HENNIGAN, R.F.; KLOSE, K.E.; HANCOCK, R.E.; PLATT, M.D.; HUNT, D.F. Bacterial biofilms of importance to medicine and bioterrorism: proteomic techniques to identify novel vaccine components and drug targets. **Expert Opinion on Biological Therapy**, v. 3, p. 1201-1207, 2003.
- ⁷⁶ 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.
- ⁷⁷ PEDERSEN, S.S.; HOIBY, N.; ESPERSEN, F.; KOCH, C. Role of alginate in infection with mucoid *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis. **Thorax**, v. 47, p. 6–13, 1992.
- ⁷⁸ GOVAN, J.R.W.; DERETIC, V. Microbial pathogenesis in cystic fibrosis: mucoid *Pseudomonas aeruginosa* and *Burkholderia cepacia*. **Microbiology Reviews**, v. 60, p. 539–574, 1996.
- ⁷⁹ LYCZAK, J.B.; CANNON, C.L.; PIER, G.B. Lung infections associated with cystic fibrosis. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 15, p. 194–222, 2002.
- ⁸⁰ OBRITSCH, M.D.; FISH, D.N.; MACLAREN, R.; JUNG, R. National surveillance of antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa* isolates obtained from intensive care unit patients from 1993 to 2002. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 48, p. 4606-4610, 2004.
- ⁸¹ HUNGRIA, M.; NICOLÁS, M.F.; GUIMARÃES, C.T.; JARDIM, S.N.; GOMES, E.A.; VASCONCELOS, A.T. Tolerance to stress and environmental adaptability of *Chromobacterium violaceum*. **Genetics and Molecular Research**, v. 3, p. 102-116, 2004.

-
- ⁸² ANTONIO, R.V.; CRECZYNSKI-PASA, T.B. Genetic analysis of violacein biosynthesis by *Chromobacterium violaceum*. **Genetics and Molecular Research**, v. 3, p. 85-91, 2004.
- ⁸³ SIVENDRA, R.; TAN, S.H. Pathogenicity of nonpigmented cultures of *Chromobacterium violaceum*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 5, p. 514-516, 1977.
- ⁸⁴ MCCLEAN, K.H.; WINSON, M.K.; FISH, L.; TAYLOR, A.; CHHABRA, S.R.; CAMARA, M.; DAYKIN, M.; LAMB, J.H.; SWIFT, S.; BYCROFT, B.W.; STEWART, G.S.; WILLIAMS, P. Quorum sensing and *Chromobacterium violaceum*: exploitation of violacein production and inhibition for the detection of N-acylhomoserine lactones. **Microbiology**, v. 143, p. 3703-3711, 1997.
- ⁸⁵ SWEM, L.R.; SWEM, D.L.; O'LOUGHLIN, C.T.; GATMAITAN, R.; ZHAO, B.; ULRICH, S.M.; BASSLER, B.L. A quorum-sensing antagonist targets both membrane-bound and cytoplasmic receptors and controls bacterial pathogenicity. **Molecular Cell**, v. 35, p. 143-53, 2009.
- ⁸⁶ LEON, L.L.; MIRANDA, C.C.; DE SOUZA, A.O.; DURAN, N. Antileishmanial activity of the violacein extracted from *Chromobacterium violaceum*. **Journal of Antimicrobial and Chemotherapy**, v. 48, p. 449-450, 2001.
- ⁸⁷ ANDRIGHETTI-FRÖHNER, C.R.; ANTONIO, R.V.; CRECZYNSKI-PASA, T.B.; BARARDI, C.R.M.; SIMÕES, C.M.O. Cytotoxicity and potential antiviral evaluation of violacein produced by *Chromobacterium violaceum*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 98, p. 843-848, 2003.
- ⁸⁸ UEDA, H.; NAKAJIMA, H.; HORI, Y.; GOTO, T.; OKUHARA, M. FR901228, a novel antitumor bicyclic depsipeptide produced by *Chromobacterium violaceum* n^o. 968.III. Taxonomy, fermentation, isolation, physico-chemical and biological properties. **The Journal of Antibiotics**, v. 47, p. 301-310, 1994.
- ⁸⁹ SOUZA, A.O. DE; AILY, D.C.G.; SATO, D.N.; DURAN, N. Atividade da violaceína *in vitro* sobre o *Mycobacterium tuberculosis* H37RA. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 58, 59-62, 1999.
- ⁹⁰ CHERNIN, L.S.; WINSON, M.K.; THOMPSON, J.M.; HARAN, S.; BYCROFT, B.W.; CHET, I.; WILLIAMS, P.; STEWART, G.S.A.B. Chitinolytic activity in *Chromobacterium violaceum*: substrate analysis and regulation by quorum sensing. **Journal of Bacteriology**, v. 180, p. 4435-4441, 1998.
- ⁹¹ STEINBÜCHEL, A.; DEBZI, E.M.; MARCHESSAULT, R.H.; TIMM, A. Synthesis and production of poly (3-hydroxyvaleric acid) homopolyester by *Chromobacterium violaceum*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 39, p. 443-449, 1993.

-
- ⁹² CAREPO, M.S.P.; AZEVEDO, J.S.N.; PORTO, J.I.R.; BENTES-SOUZA, A.R.; BATISTA, J.S.; SILVA, A.L.C., SCHNEIDER, M.P.C. Identification of *Chromobacterium violaceum* genes with potential biotechnological application in environmental detoxification. **Genetics and Molecular Research**, v. 3, p. 181-194, 2004.
- ⁹³ MCLEAN, R.J.;PIERSON, L.S.; FUQUA, C. A simple screening protocol for the identification of quorum signal antagonists. **Journal of Microbiological Methods**, v. 58, p. 351-60, 2004.
- ⁹⁴ CHEN, C.H.; LIN, L.C.; LIU, C.E.; YOUNG, T.Z. *Chromobacterium violaceum* bacteremia: a case report. **Journal of Microbiology, Immunology and Infection**, v. 36, p. 141-144, 2003.
- ⁹⁵ BRITO, C.F.A.; CARVALHO, C.M.B.; SANTOS, F.R.; GAZZINELLI, R.T.; OLIVEIRA, S.C.; AZEVEDO, V.; TEIXEIRA, S.M.R. *Chromobacterium violaceum* genome: molecular mechanisms associated with pathogenicity. **Genetics and Molecular Research**, v. 3, p. 148-161, 2004.
- ⁹⁶ MARTINEZ, P.; MATTAR, S. Fatal septicemia caused by *Chromobacterium violaceum* in a child from Colombia. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 49, p. 391-393, 2007.
- ⁹⁷ CROSSE, P.A.; SOARES, K.; WHEELER, J.L.; COOKE, K.L.; ADIN, C.A.; O'KELLEY, J.J.; LEVY, J.K. *Chromobacterium violaceum* infection in two dogs. **Journal of the American Animal Hospital Association**, v. 42, p. 154-159, 2006.
- ⁹⁸ SIRINAVIN, S.; TECHASAENSIRI, C.; BENJAPONPITAK, S.; PORNKUL, R.; VORACHIT, M. Invasive *Chromobacterium violaceum* infection in children: case report and review. **Pediatric Infectious Disease Journal**, v. 24, p. 559-561, 2005.
- ⁹⁹ CHANG, C.Y., LEE, Y.T., LIU, K.S., WANG, Y.L., TSAO, S.M. *Chromobacterium violaceum* infection in Taiwan: a case report and literature review. **Journal of Microbiology, Immunology and Infection**, v. 40, p. 272-275, 2007.
- ¹⁰⁰ LIM, I.W.; STRIDE, P.J., HORVATH, R.L., HAMILTON-CRAIG, C.R., CHAU, P.P. *Chromobacterium violaceum* endocarditis and hepatic abscesses treated successfully with meropenem and ciprofloxacin. **The Medical Journal of Australia**, v. 190, p. 386-387, 2009.
- ¹⁰¹ MARTINEZ, R.; VELLUDO, M.A.; SANTOS, V.R.; DINAMARCO, P.V. *Chromobacterium violaceum* infection in Brazil. A case report. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, 42, p. 111-113, 2000.
- ¹⁰² JENSEN, P.R.; FENICAL, W. Marine bacterial diversity as a resource for novel microbial products. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 17, p.346–351, 1996.

-
- ¹⁰³ ANAND, T.P.; BHAT, A.W.; SHOUCHE, Y.S.; ROY, U.; SIDDHARTH, J.; SARMA, S.P. Antimicrobial activity of marine bacteria associated with sponges from the waters off the coast of South East India. **Microbiological Research**, v. 161, p. 252-262, 2006.
- ¹⁰⁴ STEPANOVIC, S.; VUKOVIC, D.; HOLA, V.; BONAVENTURA, G.; DJUKIC, S. CIRKOVIC, I.; RUZICKA, F. A. Quantification of biofilm in microtiter plates: overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by staphylococci. **Acta Pathologica, Microbiologica et Immunologica Scandinavica**, v. 115, p. 891-899, 2007.
- ¹⁰⁵ Disponível em <http://www.condalab.com/pdf/1059.pdf>. Acesso em 25 de novembro de 2009.
- ¹⁰⁶ HERTWECK, C. Hidden biosynthetic treasures brought to light. **Nature Chemical Biology**, v. 5, p. 450-452, 2009.
- ¹⁰⁷ MARKETON, M. M.; GLENN, S.A.; EBERHARD, A.; GONZÁLEZ, J.E. Quorum sensing controls exopolysaccharide production in *Sinorhizobium meliloti*. **Journal of Bacteriology**, v. 185, p. 325–331, 2003.
- ¹⁰⁸ VON BODMAN, S.B.; MAJERCZAK, D.R.; COPLIN, D.L. A negative regulator mediates quorum-sensing control of exopolysaccharide production in *Pantoea stewartii* subsp. *stewartii*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 95, p. 7687-7692, 1998.
- ¹⁰⁹ CLATWORTHY, A.E.; PIERSON, E.; HUNG, D.T. Targeting virulence: a new paradigm for antimicrobial therapy. **Nature Chemical Biology**, v. 3, p. 541-548, 2007.
- ¹¹⁰ LE ROUX, P.; BLANOT, D.; MENGIN-LECREULX, D.; VAN HEIJENOORT, J. Peptides containing 2-aminopimelic acid. Synthesis and study of in vitro effects on bacterial cells. **International Journal of Peptide and Protein. Research.**, v. 37, p. 103-111, 1991.
- ¹¹¹ BERGES, D.A.; DEWOLF, W.E. JR.; DUNN, G.L.; GRAPPEL, S.F.; NEWMAN, D.J.; TAGGART, J.J.; GILVARG, C. Peptides of 2-aminopimelic acid: antibacterial agents that inhibit diaminopimelic acid biosynthesis. **Journal of Medical Chemistry**, v. 29, p. 89-95, 1986..
- ¹¹² DONLAN, R.M.. Biofilm formation: a clinically relevant microbiological process. **Clinical Infectious Disease**, v. 33, p. 1837–1392, 2001.
- ¹¹³ Centers of Disease Control and Prevention. Guidelines for the prevention of intravascular catheter-related infections. **MMWR Morbidity and Mortality Weekly Report**, v. 51, p. 1-26, 2002.