

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE FARMÁCIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Isolamento, investigação química e avaliação do potencial antibiótico, antibiofilme e anti-*Trichomonas vaginalis* de fungos associados a organismos marinhos da Costa Sul do Brasil

MARINA SCOPEL

PORTO ALEGRE, 2012



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE FARMÁCIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Isolamento, investigação química e avaliação do potencial antibiótico, antibiofilme e anti-*Trichomonas vaginalis* de fungos associados a organismos marinhos da Costa Sul do Brasil.

Tese apresentada por **Marina Scopel** para obtenção do TÍTULO DE DOUTOR em Ciências Farmacêuticas

Orientadora: Profa. Dr. Amélia Teresinha Henriques

Orientador: Prof. Dr. Alexandre José Macedo

PORTO ALEGRE, 2012.

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, em nível de Doutorado Acadêmico da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e aprovada em 27.02.2012, pela Banca Examinadora constituída por:

Prof. Dr. Ademir Farias Morel

Universidade Federal de Santa Maria

Prof. Dr. Charley Christian Staats

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Profa. Dr. Sueli Teresinha Van der Sand

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Scopel, Marina

Isolamento, investigação química e avaliação do potencial antibiótico, antibiofilme e anti-Trichomonas vaginalis de fungos associados a organismos marinhos da Costa Sul do Brasil / Marina Scopel. -- 2012.  
215 f.

Orientadora: Amélia T. Henriques.

Orientador: Alexandre J. Macedo.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Farmácia, Programa de Pós- Graduação em Ciências Farmacêuticas, Porto Alegre, BR-RS, 2012.

1. fungos marinhos. 2. atividade antibiótica. 3. atividade antibiofilme. 4. atividade anti-Trichomonas vaginalis. 5. bioprospecção. I. Henriques, Amélia T., orient. II. Macedo, Alexandre J., orient. III. Título

Este trabalho foi desenvolvido nos Laboratórios de Farmacognosia, Tecnologia Bioquímica e Parasitologia da Faculdade de Farmácia, no Laboratório de Peptídeos e Enzimas Proteolíticas do Centro de Biotecnologia e no Helmholtz Centre for Infection Research, na cidade de Braunschweig, Alemanha. O autor recebeu bolsa de estudos do CNPq e DAAD.



*Dedico à Assis, Beatriz, Cláudia, Cuca e,  
em especial, meu sobrinho João Vítor.*





## AGRADECIMENTOS

À força suprema que rege o Universo.

Aos professores Dr<sup>a</sup>. Amélia T. Henriques e ao Dr. Alexandre José Macedo por ter acreditado no meu potencial de encarar um inovador e grande desafio. A cada um, um agradecimento em especial.

Ao professor Dr. Carlos Termignoni pelo apoio nos experimentos de microbiologia e ao professor Wolf-Rainer Abraham pela orientação na realização do estágio doutoral no Helmholtz Centre for Infection Research (Alemanha).

Às professoras Miriam Apel e Tiana Tasca pelo apoio e Raquel Giordani pelo otimismo, força e amizade iluminada.

Aos colegas e amigos do Laboratório de Farmacognosia 505-H: Ana Aboy, Carla, Cláudia, Cristiano, Douglas, Grazielle, Juliana, Leandro, Letícia, Melissa, Renata e Roger, e porventura aqueles que já seguiram seus caminhos.

Aos colegas e amigos do Grupo de pesquisa de biofilmes e diversidade microbiana e do Laboratório de peptídeos e enzimas proteolíticas: Adriana, Aninha, Clara, Janine, Lucas, Matheus, Sharon, Suzana, William, especialmente Danielle Arruda, Danielle Trentin, Karine e Viviane pelos grandes momentos científicos e recreativos.

Às meninas do Laboratório de Parasitologia, especialmente a Odelta.

Aos bolsistas e auxiliares de laboratório que fizeram e fazem parte dos grupos.

Às pessoas responsáveis direta ou indiretamente pela realização do meu estágio doutoral em Braunschweig: Maira Peres, Andréia Estrela, Daiana, Jucéli e Felícia Morales, Diego C. Moreno, Adriane Barth, Bettina Klug, Amélia Silva, Márcia Duarte, entre outros amigos e companheiros.

Às grandes amigadas e muito especiais, mais recentes, Igor e Mariana; de década Carolina, Eduardo, Rafaela, Tiago, Júlia e Fernanda; e de século Lisiane (representante de Caxias do Sul) pelos aconselhamentos, paciência e momentos muito maravilhosos que passamos juntos.

E àquelas pessoas que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho ou estiveram presentes ao meu lado nesta jornada.



“No momento em que nos comprometemos, a providência divina também se põe em movimento. Todo um fluir de acontecimentos surge ao nosso favor. Como resultados da atitude, seguem todas as formas imprevistas de coincidências, encontros e ajuda que nenhum ser humano jamais poderia ter sonhado encontrar. Qualquer coisa que você possa fazer ou sonhar, você pode começar.  
A coragem contém em si mesma, o poder, o gênio e a magia”.

*Goethe*



## RESUMO

Fungos isolados de organismos marinhos têm despertado o interesse de pesquisadores no mundo inteiro, por representarem uma fonte diferenciada de metabólitos secundários, devido às condições ambientais as quais esses microrganismos estão sujeitos. Diversas atividades biológicas têm sido relatadas para estas substâncias, principalmente antitumoral, antimicrobiano e antiparasitária. O crescente aumento nos casos de resistência a antibióticos aponta para a necessidade da disponibilidade de novos agentes terapêuticos. Neste contexto, este trabalho objetivou a identificação dos fungos associados a organismos marinhos coletados na Ilha do Arvoredo (SC), visando o isolamento bio guiado de metabólitos de extratos de micélio e meios de cultivo. As atividades antibiótica e antibiofilme frente aos patógenos *Staphylococcus epidermidis* ATCC 35984 e *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 e anti-*Trichomonas vaginalis* ATCC 30236 e isolados clínicos, foram investigadas. Todos os fungos isolados foram cultivados por períodos de 7, 14 e 21 dias. Utilizando técnicas moleculares, foram identificados 37 fungos pertencentes ao Filo Ascomycota e um ao Filo Basidiomycota, distribuídos entre 15 diferentes gêneros. O rastreamento de metabólitos quanto à atividade antibiótica foi realizado utilizando a técnica de difusão em agar, obtendo-se 19 amostras com halos de inibição superiores a 10 mm de diâmetro. As atividades antif formação e erradicação de biofilme previamente formado foram avaliadas pelo método de coloração com cristal violeta, e 5% do total de amostras apresentaram inibição de formação e 1% a erradicação de mais de 75% de biofilme de *S. epidermidis*. Da mesma forma, 5% das amostras foram capazes de inibir ou erradicar entre 51% e 75% biofilmes de *P. aeruginosa*. Entre os isolados, foram selecionados um fungo pertencente à ordem Sordariales (isolado F22, 14 dias de cultivo) e outro ao gênero *Penicillium* (isolado F37, 7 dias de cultivo). Os filtrados dos fungos foram particionados com acetato de etila e submetidos à separação cromatográfica, levando à identificação dos compostos mevalonolactona e *cis-cyclo*(leucyl-tyrosyl) (identificados por técnicas espectroscópicas e espectrométricas), ambos ativos na inibição da formação de biofilme de *S. epidermidis* ATCC. Mevalonolactona também apresentou atividade frente a isolados clínicos de *S. epidermidis* revelando, além da atividade antibiofilme, atividade antibiótica em concentração de 0,06 mg/mL. A atividade frente ao parasita *T. vaginalis* foi avaliada pela técnica de coloração de resazurina e a viabilidade dos trofozoítos caracterizada utilizando *trypan blue*. Duas

amostras dos fungos *Hipocrea lixii* e *Penicillium citrinum* mostraram a presença de metabólitos ativos. A inibição do crescimento dos trofozoítos foi observada em 24 horas (MIC=2,5 mg/mL), de acordo com a curva cinética de crescimento. A ausência de hemólise de eritrócitos também foi observada para estas duas amostras. Os resultados obtidos corroboram com os relatos sobre o grande potencial dos fungos marinhos para a descoberta de metabólitos ativos.

Palavras-chave: fungos marinhos, antibiótico, antibiofilme, anti-*Trichomonas vaginalis*, mevalonolactona, *cis-cyclo*(leucyl-tyrosyl)

## ABSTRACT

*Isolation, chemical investigation and evaluation of antibiotic, antibiofilm and anti-Trichomonas vaginalis activities of fungi associated to marine organisms from South Brazilian Coast.*

Fungi isolated from marine organisms attract the interest of many researchers around the world, since they produce differentiated secondary metabolites due to the environmental conditions to which these organisms are subjected. Several biological activities have been reported for these compounds, mainly as antitumoral, antibacterial and, antiprotozoal. The increasing cases of antimicrobial drug resistance reveal the necessity for the search for new therapeutic agents. In this context, this study aimed to identify the fungi associated with marine organisms collected in the Arvoredo Island (SC/Brazil), in order to isolate bioactive metabolites in extracts of mycelia and broth. The antibiotic and antibiofilm activities against *Staphylococcus epidermidis* ATCC 35984 and *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 and anti-*Trichomonas vaginalis* ATCC 30236 and clinical isolates activity were investigated. The isolated fungi from marine organisms were cultured for 7, 14 and 21 days. Using molecular techniques, 36 fungi belonging to the Ascomycota and one to Basidiomycota phyla, were identified, distributed among 15 different genera. Screening for metabolites possessing antibiotic activity was performed using the agar diffusion assay, for which was obtained 19 samples with inhibition halo higher than 10 mm in diameter. The inhibition and eradication of biofilm were performed by crystal violet staining method, and 5% of the total samples showed inhibition and 1% eradication of more than 75% of *S. epidermidis* biofilm. Moreover, 5% of the samples were able to inhibit and eradicate between 51% and 75% of biofilm formed by *P. aeruginosa*. Among these samples, one strain belonging to the order Sordariales (isolate F22, 14-days of culture) and one to the genus *Penicillium* (isolate F37, 7-days of culture) were selected. The filtrate was extracted with ethyl acetate and subjected to separation by chromatographic techniques, leading to purified compounds mevalonolactone and *cis-cyclo*(leucyl-tyrosyl) (identified by spectroscopic and spectrometric techniques), both able to inhibit biofilm formation by *S. epidermidis* ATCC. Mevalonolactone also showed activity against clinical isolates of *S. epidermidis* revealing, both antibiofilm and antibiotic activities at 0.06 mg.mL<sup>-1</sup>. The anti-*T. vaginalis* assay was carried out using the resazurin staining method and

viability of trophozoites were characterized using trypan blue. Two samples of the fungi *Hypocrea lixii* and *Penicillium citrinum* showed the presence of active metabolites able to inhibit the trophozoites growth in 24 hours (MIC = 2.5 mg.mL<sup>-1</sup>), according to the kinetic curve of growth. Absence of hemolysis of erythrocytes was also observed for these two filtrate samples. The results corroborate with the reports of the great potential of marine fungi in the discovery of active metabolites.

Key words: marine-associated fungi, antibiotic, antibiofilm, anti-*Trichomonas vaginalis*, mevalonolactone, *cis-cyclo*(leucyl-tyrosyl)



## LISTA DE FIGURAS

### 42III. REVISÃO DO TEMA

Figura 1. Distribuição de produtos naturais marinhos por filo relacionando o número de compostos isolados por ano (1998-2010)..... 39

Figura 2. Ocorrência de fungos filamentosos em amostras de organismos marinhos..... 44

Figura 3. Rota biossintética dos metabólitos secundários de fungo..... 45

Figura 4. Estágios do ciclo de vida de um biofilmes..... 50

Figura 5. Representação do sistema *quorum-sensing*..... 53

Figura 6. Moléculas inibidoras de *quorum-sensing*..... 56

### IV. Artigo 1

Figure 1. Phylogenetic tree of partial ITS-rDNA sequences of marine associated fungal strains..... 84

Figure 2. Percentage of activity of fungi filtrate samples (7, 14 and 21 days of cultivate) upon *S. epidermidis* and *P. aeruginosa* biofilm..... 85

### V. Artigo 2

Figure 1. Antibiofilm and antibacterial activities of semi-purified samples against *S. epidermidis*..... 110

Figure 2. Evaluation of *S. epidermidis* biofilm formation of MVL..... 111

Figure 3. Scanning electron microscopy images of *S. epidermidis* biofilm formation..... 112

### VI. Artigo 3

Figure 1. Correlations of 2D NMR of *cis-cyclo*(leucyl-tyrosyl)..... 132

Figure 2. Evaluation of antibiofilm and antibacterial activities of *cis-cyclo*(leucyl-tyrosyl) against *S. epidermidis*..... 133

Figure 3. Scanning electron microscopy images of *S. epidermidis* biofilm formation..... 134

### VII. Artigo 4

Figure 1. *Hypocrea lixii* associated fungi from sponge *Axinella corrugate* and *Penicillium citrinum* associated fungi from the sponge *Stoeba* sp..... 158

Figure 2. Effect of filtrate samples F02 and F40 on *T. vaginalis* kinetic growth curve..... 159

Figure 3. Effect of filtrate samples F02 and F40 on *T. vaginalis* trypan blue exclusion..... 160

## VIII. DISCUSSÃO GERAL

Figura 7. Localização geográfica da Reserva Biológica Marinha do Arvoredo	164
Figura 8. Representação esquemática da região rDNA com a localização dos primers ITS1F e ITS4.....	166
Figura 9. Fungos associados às esponjas <i>Mycale magnirhaphidifera</i> e <i>Axinela corrugata</i> .....	170
Figura 10. Perfil cromatográfico do extrato bruto orgânico do filtrado do fungo <i>Penicillium</i> sp.....	172
Figura 11. Avaliação das atividades antibiofilme e antibacteriana das frações isoladas do extrato orgânico do isolado F37 frente a <i>S. epidermidis</i> .....	173

## LISTA DE TABELAS

### III. REVISÃO DO TEMA

Tabela 1. Produtos naturais marinhos presentes em estudos de fase clínica. 37

Tabela 2. Exemplos de sinalizadores *quorum-sensing* microbianos..... 54

### IV. Artigo 1

Table 1. Identification of fungal strains according the host organism based on DNA analysis presenting the closest relatives to fungal strains..... 86

Table 2. Evaluation of antibacterial and antibiofilm activities of 41 marine-associated fungi against *S. epidermidis*..... 87

Table 3. Evaluation of antibacterial and antibiofilm activities of 41 marine-associated fungi against *P. aeruginosa*..... 88

### V. Artigo 2

Table 1. Antibiofilm and antibacterial activities of MVL against *S. epidermidis* clinical isolates and profiles of susceptibility..... 113

### VII. Artigo 4

Table 1. Species from the marine-associated fungi screened against *T. vaginalis*..... 154

Table 2. Minimum inhibitory concentrations (MIC) of marine-associated fungi filtrate for different *T. vaginalis* isolates..... 155

Table 3. Hemolytic effect of F02 and F40 marine associated fungi filtrate..... 156



## SUMÁRIO

<b>I. INTRODUÇÃO</b>	21
<b>II. OBJETIVOS</b>	29
<b>III. REVISÃO DO TEMA</b>	33
III. 1 Produtos Naturais Marinhos.....	35
III. 2 Organismos Marinhos e Microrganismos Associados.....	38
III. 3 Fungos Marinhos: Generalidades, Química e Atividades biológicas.....	41
III. 4 Resistência Bacteriana e Biofilmes Patogênicos.....	48
III. 5 Antiparasitários: <i>Trichomonas vaginalis</i> .....	57
<b>IV. Artigo 1.</b>	
Sponge-associated fungi from South Brazilian Coast present remarkable antibiofilm and antibiotic activities.....	61
<b>V. Artigo 2.</b>	
Mevalonolactone an inhibitor of <i>Staphylococcus epidermidis</i> adherence and biofilm formation.....	89
<b>VI. Artigo 3.</b>	
Sponge-associated <i>Penicillium</i> sp. produces <i>cis-cyclo</i> (leucyl-tyrosyl) dipeptide able to inhibit <i>Staphylococcus epidermidis</i> biofilm formation.....	115
<b>VI. Artigo 4.</b>	
Anti- <i>Trichomonas vaginalis</i> activity of marine-associated fungi from South Brazilian Coast.....	135
<b>VIII. DISCUSSÃO GERAL</b>	161
<b>IX. CONCLUSÕES</b>	177
<b>X. PERSPECTIVAS</b>	181
<b>XI. REFERÊNCIAS</b>	185







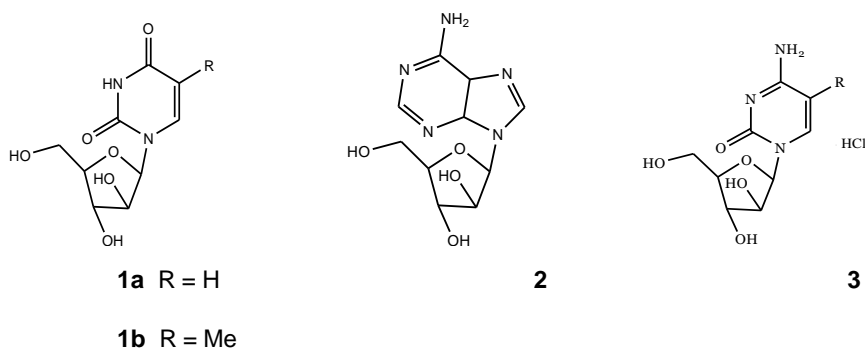




Estudos do papel desempenhado pelos produtos naturais na ecologia de diferentes tipos de organismos podem levar à descoberta de novos compostos de origem natural com potencial bioatividades (GLOER, 2007). Como exemplos, podemos citar o isolamento de diversas substâncias produzidas por plantas que atuam como defesa química contra herbívoros e, por invertebrados marinhos, responsáveis por prevenir ataques de predadores no meio em que habitam.

Produtos derivados de fontes naturais como plantas, animais e microrganismos são definidos como produtos naturais, e historicamente vem sendo investigados por indústrias farmacêuticas para produção de novos fármacos. O interesse na busca por fontes alternativas de substâncias farmacologicamente ativas como microrganismos presentes em ecossistemas extremos (regiões polares) e profundezas dos oceanos, tem despertado interesse pelo ineditismo de compostos que vem sendo encontrados (BAKER *et al.*, 2007).

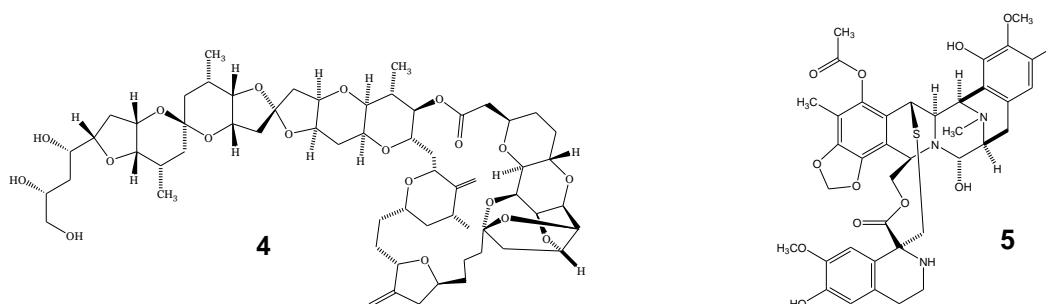
Neste contexto, a busca por moléculas bioativas provenientes de fontes como organismos marinhos iniciou-se na década de 50 com o isolamento dos nucleosídeos esponouridina (**1a**) e espongotimidina (**1b**) da esponja *Cryptotethya crypta* (BERGMANN e FEENEY, 1951), e 15 anos depois, o estudo de análogos sintéticos desses nucleosídeos levou ao desenvolvimento dos agentes antiviral e anticâncer, ARA-A (**2**; vidarabina) e ARA-C (**3**; citarabina), respectivamente, que vêm sendo usados desde então (NEWMAN *et al.*, 2000; MOLINSKI *et al.*, 2009).



Atualmente, somam-se mais de 22.000 produtos naturais marinhos obtidos de microrganismos, fitoplancton, algas (verdes, marrons e vermelhas), esponjas, cnidários, briozoários, moluscos, tunicados, equinodermos, (MARINLIT, 2011), sendo que, cerca de 15 diferentes substâncias estão em triagem clínica

principalmente nas áreas de câncer, dor e doenças inflamatórias (PROKSCH *et al.*, 2002; SALEEM *et al.*, 2007; MAYER *et al.*, 2010).

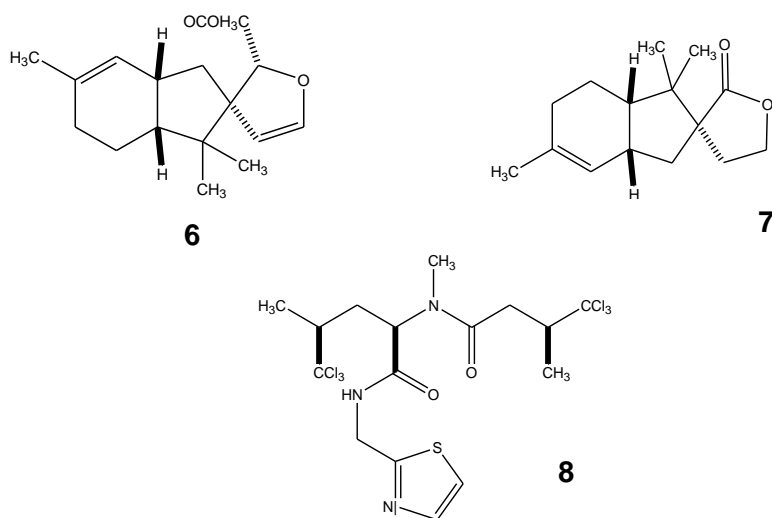
Limitações existentes quando se deseja trabalhar com organismos marinhos, principalmente tratando-se de esponjas, fazem com que sejam necessárias alternativas para a produção dos compostos de interesse. Crescimento lento do animal, dependência das estações do ano, disponibilidade de alimento para produzirem os mesmos metabólitos, produção em pequena quantidade dos compostos alvo e dificuldade de síntese das moléculas identificadas como bioativas fazem parte destas limitações (BELARBI *et al.*, 2003; LIRA, 2007). Como exemplo a produção da substância halicondrina B (**4**), policetídeo citostático isolado da esponja *Lissodendoryx* sp., é restrita a 300 mg de uma mistura de análogos partindo de uma tonelada da esponja (PROKSCH *et al.*, 2002) e, a mesma quantidade do tunicado *Ecteinascidia turbinata*, é necessária para obter aproximadamente 1 g do alcalóide antitumoral ecteinascidina/ET-743 (**5**) (MOLINSKI *et al.*, 2009).



Como alternativa para a obtenção de grande quantidade dos compostos ativos, sem exploração dos organismos marinhos, existem tentativas de cultivo de esponjas no mar, crescimento de esponjas em bioreator, sistemas de cultura de células, modificação genética e síntese ou semi-síntese. (SPIKEMA *et al.*, 2005; MANCINI *et al.*, 2007). Entre estes, a síntese ou semi-síntese seria uma das escolhas mais promissoras, porém, em muitos casos, esta abordagem tem sido economicamente inviável devido à complexidade das estruturas, necessidade de um grande número de etapas para a síntese completa da molécula e baixo rendimento dos produtos finais. Para a síntese de halicondrina B, por exemplo, são necessárias para a síntese total, 100 etapas, com um rendimento total inferior a 1% (NORCROSS e PATERSON, 1995).

Assim, devido a estas limitações, a associação encontrada entre organismos marinhos e microrganismos tem sido o foco de pesquisas, principalmente baseando-se no fato de que estas associações microbianas (bactérias, fungos, microalgas) podem envolver de 40-70% do volume tecidual de uma esponja (TAYLOR *et al.*, 2007; LI, 2009).

O desenvolvimento de pesquisas utilizando microrganismos marinhos como fonte para obtenção de moléculas bioativas tornou-se importante pela grande diversidade de espécies que podem ser isoladas. Também pela variedade e ineditismo das moléculas obtidas; pela possibilidade do cultivo *in vitro* visando à produção em escala industrial com custos mais reduzidos do que na síntese química ou realização de repetidas coletas como necessário para plantas e animais (LIRA, 2007). Igualmente, evidências sugerem que microrganismos simbiotes podem ser a verdadeira fonte de alguns metabólitos ativos isolados (JENSEN e FENICAL, 2002; PROKSCH *et al.*, 2003; LI, 2009) como é o caso dos sesquiterpenos espirodisina (**6**) e herbadisidolideo (**7**) e o derivado de aminoácido 13-dimetilisodisedenina (**8**), identificados na esponja *Dysidea herbacea* também presentes em seu simbiote, a cianobactéria *Oscillatoria spongelliae* (PROKSCH *et al.*, 2002).



Fungos marinhos constituem um dos grupos ecológicos menos estudados (LI e WANG, 2009). Nos últimos anos, a comunidade científica tem se preocupado com o desenvolvimento de novos medicamentos e estão identificando estes microrganismos como nova fonte para atender a demanda de compostos bioativos e com potencial para uso clínico (SUN *et al.*, 2009).

Atualmente, um derivado sintético da dicetopiperazina halimida (NPI-2350), isolado de um fungo de origem marinha pertencente ao gênero *Aspergillus*, a molécula NPI-2358 está em Fase II de estudo clínico para atividade antitumoral (COSTA-LOTUFO *et al.*, 2009). Os produtos isolados de fontes marinhas também são considerados promissores antibióticos, porém substâncias obtidas de fungos marinhos ainda não estão incluídas em estudos clínicos para este fim.

Doenças infecciosas são a terceira causa de mortes no mundo e a primeira em países subdesenvolvidos, destacando-se infecções do trato respiratório, diarreias e tuberculose (WHO, 2011), ressaltando a importância da pesquisa de novas moléculas com propriedades antibióticas. Adicionalmente, a resistência bacteriana a antibióticos agrava esses números, indicando a necessidade de emprego de novas estratégias antibacterianas (PROJAN, 2003). Programas de *High-Throughput Screening* de produtos naturais isolados de microrganismos vêm sendo desenvolvidos visando à descoberta de novos fármacos eficazes contra microrganismos resistentes, principalmente pelas indústrias farmacêuticas (LIU *et al.*, 2010; SIMMONS *et al.*, 2010).

A taxa de desenvolvimento de novos antimicrobianos pela indústria farmacêutica diminuiu nos últimos 20-30 anos, enquanto que a resistência bacteriana a esse tipo de medicamento aumentou progressivamente (SALMOND e WELCH, 2008). O custo para o lançamento de um novo fármaco antimicrobiano no mercado gira em torno de 800 milhões de dólares o que torna esta classe economicamente desinteressante quando comparado ao lucro com medicamentos utilizados para tratamento de doenças como câncer, cardiovasculares, obesidade e diabetes (DiMASSA *et al.*, 2003; SALMOND e WELCH, 2008). Assim, antimicrobianos são vítimas de seu próprio sucesso; sendo menos interessantes como objetos de pesquisas em indústrias farmacêuticas, quando comparados com medicamentos inovadores (SPELLBERG *et al.*, 2008).

No mesmo sentido estão as infecções parasitárias como a tricomonose, doença sexualmente transmitida não viral mais prevalente no mundo (WHO, 2001), causada pelo protozoário *Trichomonas vaginalis*. A Organização Mundial da Saúde (OMS) estima que cerca de 180 milhões de pessoas são anualmente infectadas no

mundo, sendo a incidência da infecção por *T. vaginalis* mais frequente que as causadas por *Chlamydia trachomatis* (92 milhões) e *Neisseria gonorrhoeae* (62 milhões) (FICHOROVA, 2009).

Os fármacos de escolha na terapia anti-*T. vaginalis* pertencem ao grupo dos 5-nitroimidazóis (HELMS *et al.*, 2008) entretanto, efeitos carcinogênicos e teratogênicos, bem como reações adversas frequentes tem sido relacionados. Além disso, o surgimento de isolados clínicos ou laboratoriais de *T. vaginalis* resistentes a esses fármacos torna-se um agravante para o sucesso do tratamento da doença (DUNNE *et al.*, 2003; UPCROFT *et al.*, 2006; GOLDMAN *et al.*, 2009).

Frente à estes impasses, novos e potentes agentes bactericidas ou antiparasitários vem sendo obtidos com sucesso, pelo desenvolvimento racional de novas gerações de antibióticos visando suplantar a resistência ou a partir de programas direcionados a descoberta de novos produtos naturais bioativos (SILVEIRA *et al.*, 2006).

Considerando a necessidade de busca de novos fármacos, este trabalho tem como objetivo o isolamento e a identificação de potenciais antibióticos, antibiofilmes patogênicos e anti-*T. vaginalis*. Como fonte, fungos isolados a partir de organismos marinhos coletados no litoral Sul brasileiro foram utilizados, reforçando a relevância deste trabalho uma vez que não existem relatos de fungos isolados deste ambiente marinho.







---

## II. OBJETIVOS





Os objetivos gerais deste trabalho foram investigar a diversidade química de metabólitos produzidos por fungos associados a organismos marinhos e avaliar seus potenciais antibiótico, antibiofilmes patogênicos e anti-*T. vaginalis*.

Os objetivos específicos incluem:

- Isolar fungos associados a organismos marinhos coletados da Costa Sul do Brasil;
- Identificar, utilizando técnicas moleculares, os fungos marinhos isolados;
- Selecionar fungos marinhos por meio de rastreamento para as atividades antibiótica, antibiofilme e antiparasitária;
- Obter biomassa dos fungos que apresentaram atividade para prospecção das moléculas ativas;
- Isolar e elucidar a(s) estrutura(s) do(s) metabólito(s) presente(s) no(s) extrato(s) identificado(s) como bioativo(s).













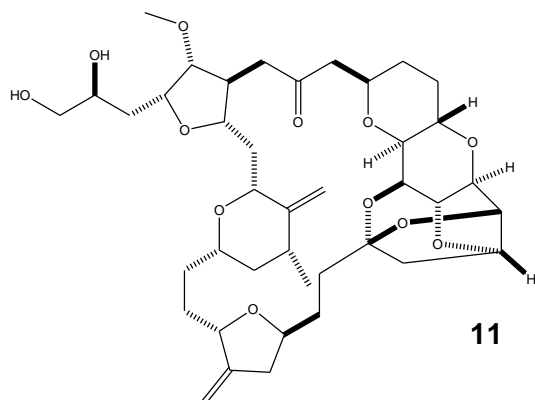
### III. 1 Produtos Naturais Marinhos

O papel dos produtos naturais no desenvolvimento de novos fármacos tem sofrido muitas mudanças nos últimos 30 anos, com um notável declínio do interesse das maiores indústrias farmacêuticas a partir da metade dos anos 90. Nos últimos 5 anos porém, houve o renascimento desse campo de pesquisa, com o emprego de novas técnicas analíticas, espectroscópicas e a prospecção de atividades biológicas por *High-Throughput Screening* (BAKER *et al.*, 2007; LAM, 2007; MOLINSKI *et al.*, 2009). No entanto, 80% dos fármacos que estão em uso são ou foram inspirados em produtos naturais estudados da forma clássica (COSTA-LOTUFO *et al.*, 2009).

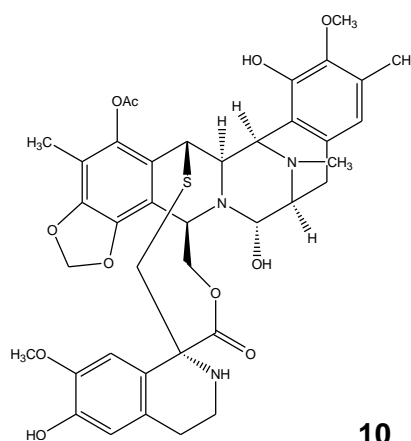
Tratando-se de produtos naturais de origem marinha, após o advento dos fármacos Vidarabina e Citarabina na década de 70, outro fármaco foi aprovado pelo *Food and Drug Administration* (FDA) nos Estados Unidos, o ziconotídeo (**9**) (derivado sintético de  $\omega$ -conotoxina MVIIA), comercialmente denominado Prialt™ e utilizado para o tratamento de dor crônica na medula espinhal (COSTA-LOTUFO *et al.*, 2009; MOLINSKI *et al.*, 2009). O isolamento desta substância foi realizado por pesquisadores americanos em 1979, a partir do molusco *Conus magnus*, porém sua síntese completa foi finalizada somente em 1987 (MOLINSKI *et al.*, 2009). O segundo fármaco derivado de fonte marinha, aprovado pela Comissão Européia, foi isolado do tunicado *Ecteinascidia turbinata* (ecteinascidina; ET-743) no ano de 1969. A síntese completa do derivado sintético trabectedina (**10**), foi finalizada em 1996 e o medicamento lançado no mercado em 2007 sob nome comercial de Yondelis®, utilizado para sarcoma avançado dos tecidos moles (COSTA-LOTUFO *et al.*, 2009; MOLINSKI *et al.*, 2009). Isolada da esponja *Halichondria okadai* no ano de 1986, a substância halicondrina B foi sintetizada completamente em 1992 (AICHER *et al.*, 1992). Empregada em ensaios contra câncer de mama metastático, foi realizada a síntese de seu análogo mesilato de eribulina (**11**), o qual, após ensaios clínicos, foi aprovado para este fim em 2010 pelo FDA sob o nome comercial de Halaven® (JAIN e VAHDAT, 2011; ERIBULIN, 2012).



9



11



10

Embora, atualmente, poucos medicamentos disponíveis no mercado possuam como princípio ativo moléculas provenientes do meio marinho, muitos estão no *pipeline* dos estudos clínicos (Tabela 1) (THAKUR *et al.*, 2008). No período de 1998–2006, os estudos pré-clínicos incluíram 592 compostos derivados de fontes marinhas considerando as atividades antitumoral e citotóxica, e 666 substâncias com outras atividades relacionadas, tais como, antibacteriana, anticoagulante, anti-inflamatória, antifúngica, anti-helmíntica, antiplaquetária, antiprotozoária e antiviral; ação nos sistemas cardiovascular, endócrino, imune e nervoso (MAYER *et al.*, 2010).

**Tabela 1.** Produtos naturais marinhos presentes em estudos de fase clínica (Adaptado de MAYER *et al.*, 2010).

<b>Estatus Clínico</b>	<b>Substância (Nome comercial)</b>	<b>Fonte</b>	<b>Atividade</b>
Aprovados	Citarabina, Ara-C (Cytosar-U <sup>®</sup> )	<i>Cryptotethia crypta</i> (esponja)	Anticancer
	Vidarabina, Ara-A (Vira-A <sup>®</sup> )	<i>Cryptotethia crypta</i> (esponja)	Antiviral
	Ziconotídeo (Prialt <sup>®</sup> )	<i>Conus magnus</i> (molusco)	Dor crônica medular
	Trabectedina / ET-743 (Yondelis <sup>®</sup> )	<i>Ecteinascidia turbinata</i> (tunicado)	Anticancer
	Halicondrina B e Mesilato de eribulina / E7389 (Halaven <sup>®</sup> )	<i>Halicondria okadai</i> e <i>Lissodendrorix n. sp.</i> (esponjas)	Anticancer
Fase III	Soblidotina / TZT 1027, derivado sintético da Dolastatina-10	<i>Dolabella auricularia</i> (lesma do mar)	Anticancer
	Plitidepsina (Aplidin <sup>®</sup> )	<i>Aplidium albicans</i> (tunicado)	Anticancer
Fase II	DMXBA / GTS-21 derivado sintético de Anabaseina	<i>Paranemertes peregrina</i> (minhoca marinha)	Esquizofrenia
	Plinabulina / NPI-2358	<i>Aspergillus</i> sp (fungo marinho)	Anticancer
	Elisidepsina (Irvalec <sup>®</sup> )	<i>Elysia refuscens</i> (molusco)	Anticancer
	PM 00104 (Zalypsis <sup>®</sup> )	<i>Jorunna funebris</i> (nudibrânquio)	Anticancer
	Tasidotina, Sintadotina / ILX-651, derivado sintético da Dolastatina-15	<i>Symploca</i> sp (bactéria)	Anticancer
	Pseudopterocina	<i>Pseudopterogorgia elisabethae</i> (octocoral)	Cicatrizante
	Briostatina 1	<i>Bugula neritina</i> (briozoário)	Alzheimer
Fase I	Briostatina 1	<i>Bugula neritina</i> (briozoário)	Anticancer
	ASG-5ME	<i>Molusco</i>	Anticancer
	SGN-75	<i>Molusco</i>	Anticancer
	PMO1183	<i>Tunicado</i>	Anticancer
	Hemiasterlina / E7974	<i>Hemiasterella minor</i> (esponja)	Anticancer
	Salinosporamida A / NPI-0052 (Marizomib <sup>®</sup> )	<i>Salinispora tropica</i> (actinomiceto marinho)	Anticancer

Considerando que os oceanos cobrem cerca de 70% da superfície da Terra e que contem uma extraordinária diversidade de vida (PROKSCH *et al.*, 2003), o número de substâncias já em estudo clínico, é pequeno. Observa-se então, que o meio marinho é uma fonte em potencial para o isolamento de novas substâncias químicas bioativas.

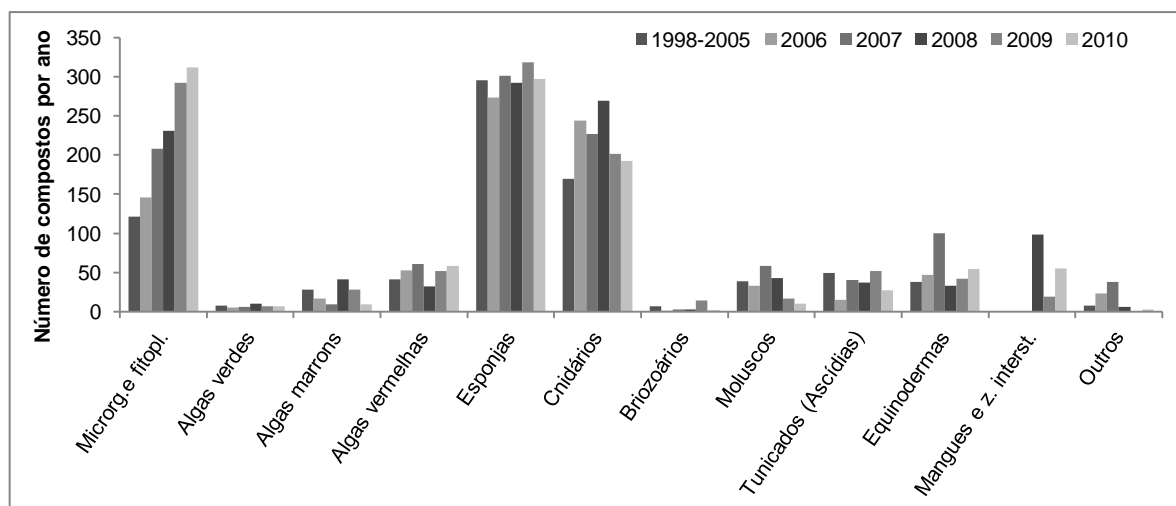
Frente à necessidade de isolamento e obtenção de quantidades suficientes de substâncias puras para a realização de estudos clínicos e posterior produção em grande escala de um fármaco, os microrganismos apresentam vantagens frente aos

organismos marinhos pela possibilidade de realização de processos fermentativos. Corroborando com esta vantagem está, a convicção de alguns pesquisadores que a verdadeira fonte de alguns dos metabólitos ativos seja, na verdade, as comunidades microbianas que vivem em simbiose com organismos marinhos (JENSEN e FENINCAL, 2002; PROKSCH *et al.*, 2002; PROKSCH *et al.*, 2003; MIAO e QIAN, 2005; LI, 2009).

No Brasil, a pesquisa com produtos naturais marinhos iniciou-se na década de 60 na Universidade Federal do Rio de Janeiro. No entanto, frente aos 7500 km de litoral brasileiro ainda são poucas as informações documentadas em artigos científicos sobre as substâncias isoladas e a atividade biológica de extratos obtidos de organismos marinhos. Este dado é indicativo do grande potencial para pesquisa nesta área no Brasil (PINTO *et al.*, 2002).

### **III. 2 Organismos Marinhos & Microrganismos Associados**

As pesquisas realizadas com produtos naturais marinhos enfatizam principalmente algas (verde, marrom, vermelha), esponjas, celenterados, briozoários, moluscos, tunicados (ascídias) e equinodermos além dos microrganismos. Segundo BLUNT *et al.* em seus trabalhos de revisão da última década (2000-2012) os organismos marinhos que apresentam maior número de estudos são as esponjas, seguidas dos cnidários e dos microrganismos simbiotes ou associados, observando-se para estes últimos, um crescimento considerável no número de substâncias isoladas (Figura 1).



**Figura 1.** Distribuição de produtos naturais marinhos por filo relacionando o número de compostos isolados por ano. Os dados de 1998 a 2005 são a média das substâncias relatadas em revisões realizadas no período (Dados reunidos de FAULKNER, 2000-2002 e BLUNT *et al.*, 2003-2012).

Esponjas (filo Porifera) são animais bentônicos sésseis e estão entre os mais velhos animais metazoários (LI, 2009). Existem cerca de 15000 espécies de esponjas descritas, mas a sua verdadeira diversidade é provavelmente maior, sendo a fauna dos poríferos da costa Atlântica da América do Sul a menos conhecida do mundo (MURICY e SILVA, 1999; BELARBI *et al.*, 2003).

Estes organismos possuem uma estrutura com uma única camada de células flageladas (coanócitos) que promovem a circulação de água através de um sistema de canais que é fundamental para sua fisiologia, pois é através dele que são feitas todas as trocas de materiais entre as esponjas e o ambiente (nutrição, respiração, excreção e reprodução) (MURIACY e HADJU, 2006; BRUSCA e BRUSCA, 2007). Pela presença deste sistema aquífero, as esponjas constituem um habitat ideal para microrganismos simbiotes (bactérias, fungos, cianobactérias e microalgas), os quais aparentam ser mutualísticos e, em alguns casos, como para a ordem Verongida, podem contribuir com 40% do seu volume corporal (WANG, 2006; BRUSCA e BRUSCA, 2007; TAYLOR *et al.*, 2007; KOOPMANS *et al.*, 2009; LI, 2009).

A produção de metabólitos secundários pela esponja geralmente ocorre pela necessidade de competição por espaço com outros organismos, proteção contra peixes, predadores e microrganismos patogênicos, proteção contra radiação

ultravioleta, entre outros (PAUL e PUGLISI, 2004; PAUL *et al.*, 2006). Os microrganismos presentes como simbioses nas esponjas marinhas muitas vezes podem contribuir na defesa química, na estrutura mecânica, como fonte de alimento e fixação de nitrogênio (WANG, 2006; TAYLOR *et al.*, 2007; TURQUE *et al.*, 2008).

O meio marinho compreende aproximadamente 3/4 da superfície do planeta e pode ser considerado um “caldo” de todos os tipos possíveis de microrganismos, sendo único em termos de composição de substâncias orgânicas e inorgânicas, bem como variações de temperatura e condições de pressão (ABDEL-LATEFF, 2004). A massiva quantidade de microrganismos encontrados nos oceanos e, principalmente, a complexidade de moléculas isoladas a partir deles, é alvo de interesse dos pesquisadores para o desenvolvimento de novos fármacos (FENICAL, 1997). Porém, no Brasil, a investigação de microrganismos marinhos da costa brasileira até 2004 foi restrita (BERLINCK *et al.*, 2004), em comparação ao número de estudos com organismos marinhos.

As profundezas do mar do litoral Catarinense vêm sendo investigadas desde o fim da década de 90, por nosso grupo de pesquisas. Os primeiros estudos envolvendo organismos marinhos, especialmente esponjas, foram realizados por LERNER *et al.* (1998a e 1998b), onde foram avaliados os potenciais anticâncer e antimicrobiano. Além disso, MONKS *et al.* (2002) avaliaram as atividades anti-quimiotática e antimicrobiana; SILVA *et al.* (2006), atividade antiviral; DRESCH *et al.* (2005, 2008, 2011, 2012), atividade lectínica e hemolítica. Recentemente, DA FROTA JR *et al.* (2009a e 2009b) realizaram importantes estudos utilizando linhagens celulares de glioma humano empregando extratos da esponja *Polymastia janeirensis* coletada na mesma região. Adicionalmente, na Universidade Federal de Rio Grande, AZEVEDO *et al.* (2008a e 2008b) avaliaram as atividades citotóxica, anti-tuberculose, anti-inflamatória e analgésica, especificamente com extratos da esponja *Aplysina caissara*. Estudos utilizando algas do litoral Catarinense também foram realizados, avaliando propriedades químicas e biológicas (LHULLIER, 2010).

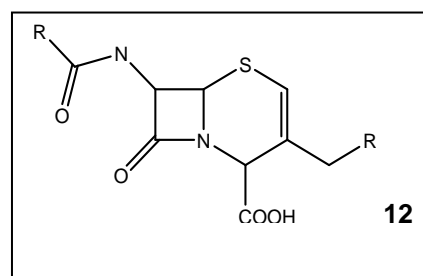
No ano de 2008, nosso grupo de pesquisa iniciou também um trabalho de prospecção de microrganismos associados com organismos marinhos, especialmente esponjas da costa Catarinense. Foram coletados 39 organismos

marinhos desta região e isoladas 160 bactérias com o fim de avaliar a capacidade de estes microrganismos produzirem compostos bioativos contra a formação e erradicação de biofilmes patogênicos (TRENTIN, 2009). Juntamente com este trabalho foi iniciada a investigação dos fungos marinhos associados, foco desta Tese, motivada pela recente e importante área de pesquisa de produtos naturais de origem de fungos e a possibilidade de identificação de novas estruturas químicas e/ou novas atividades biológicas.

### III. 3 Fungos Marinhos: Generalidades, Química e Atividades Biológicas

O Reino *Fungi* representa o segundo maior grupo de indivíduos depois dos insetos, pertencentes ao Reino *Animalia*. Existem cerca de 1,5 milhões de espécies de fungos na Terra, porém, estima-se que somente cerca de 5% de todas as espécies foram descritas. Isto significa cinco vezes mais do que plantas e 50 vezes o número estimado de bactérias (GLOER, 2007).

O interesse em micologia marinha surgiu após estudos publicados por Barghoorn e Linder em 1944. Estes autores demonstraram a existência de microrganismos marinhos que crescem e reproduzem-se em pedaços de madeira submersos após determinados períodos de tempo (DAMARE,



2006). Em outro relato da mesma década, pesquisadores isolaram o fungo marinho *Cephalosporium acremonium* de amostras de água do mar da região da Sardenha (Itália), fonte da cefalosporina C (**12**), precursora de modernos compostos antibióticos que são indispensáveis para o tratamento de numerosas infecções bacterianas (FAULKNER, 2002; PROKSCH *et al.*, 2008).

O isolamento de um fungo a partir de um organismo marinho não indica se ele é um microrganismo obrigatório ou facultativo. Segundo KOHLMAYER e KOHLMAYER (1979) fungos marinhos obrigatórios são aqueles que crescem e esporulam exclusivamente em ambiente marinho ou estuários, enquanto que facultativos são aqueles que derivam de águas e ambientes terrestres e, que são capazes de crescer (e esporular) em meio marinho. Fungos também podem



permanecer na sua forma dormente como esporo ou fragmentos de hifas, até encontrarem as condições favoráveis ao seu crescimento, quando cultivados em laboratório (GLOER, 2007; LI e WANG, 2009). O primeiro fungo marinho facultativo foi isolado por Deamazières em 1849, *Spheria typharum*, e o primeiro fungo marinho obrigatório *Sphaeria posidoniae* foi relatado por Durieu e Montage em 1869 (EFFENDI, 2004).

De fato, muitos fungos isolados de amostras marinhas não foram inequivocamente comprovados como sendo obrigatórios ou facultativos e revisões da literatura indicam que apenas uma pequena parte dos compostos descritos foi isolada de fungos marinhos obrigatórios. A adaptação metabólica dos fungos ao meio marinho explicaria o fato de que, aproximadamente, 30% dos fungos marinhos que apresentaram novos compostos pertencem aos gêneros *Penicillium* e *Aspergillus*, representantes abundantes no meio terrestre (JENSEN e FENICAL, 2002). Somente no ano de 2008, segundo revisão de BLUNT *et al.* (2010), entre os 231 microrganismos marinhos e fitoplâncton isolados, 33 pertenciam ao gênero *Penicillium* e 56 ao gênero *Aspergillus* evidenciando sua fácil adaptação a vida marinha.

A última estimativa de espécies de fungos marinhos aponta para números entre 7000-10000 considerando que, de um total de 1,5 milhões de espécies no mundo, somente 7% foram identificadas. (JONES, 2011). Inseridos nestas estimativas, os fungos marinhos obrigatórios compreenderiam cerca de 530 espécies (321 gêneros), incluindo 424 espécies de Ascomycetos (251 gêneros), 94 espécies de fungos mitospóricos (61 gêneros) e 12 espécies de Basidiomicetos (9 gêneros) (JONES *et al.* 2009; JONES, 2011).

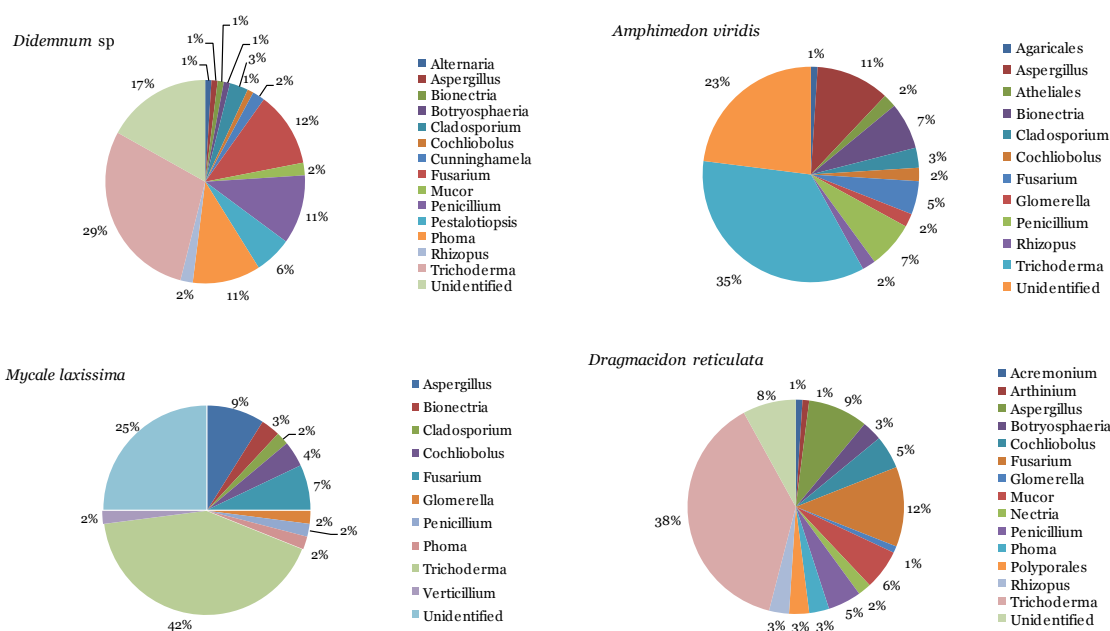
Estas espécies marinhas podem ser divididas, considerando o habitat, em cinco zonas biogeográficas: ártica, temperada, subtropical, tropical e antártica. Porém existem aqueles que vivem em águas profundas (com baixas temperaturas e altas pressões) que não estariam classificados nesta divisão por serem estas características relativamente uniformes nos oceanos (SHEARER *et al.*, 2007). HÖLLER *et al.* (2000) relatam que na busca por novos compostos isolados de fungos marinhos localizados em algumas destas regiões, um total de 681 fungos

foram isolados a partir de 16 diferentes espécies de esponjas. Os fungos isolados pertencem a gêneros de Ascomiceto (13), Zigomiceto (2), e fungos mitospóricos (37).

A diversidade dos gêneros e o número de isolados por amostra variam muito de acordo com a localidade. Fungos marinhos dos gêneros *Acremonium*, *Arthrium*, *Coniothyrium*, *Fusarium*, *Mucor*, *Penicillium*, *Phoma*, *Trichoderma*, e *Verticillium* foram isolados nas regiões temperada, subtropical e tropical, com diferentes prevalências de gênero por região. Adicionalmente certos fungos predominam em amostras de esponjas, e a prevalência de gênero pode variar em esponjas coletadas em uma mesma região (HÖLLER *et al.*, 2000).

A diferenciação destes microrganismos é fundamentada em morfologia clássica e/ou métodos bioquímicos (DAMARE, 2006). Antes da década de 1980, quando o advento das técnicas moleculares possibilitou a análise direta da variabilidade genômica, métodos de identificação e classificação de microrganismos eram apoiados principalmente em traços fenotípicos (PAFFETTI *et al.*, 1995). A falta de informação como nomenclatura correta dos organismos marinhos e os códigos genéricos referentes aos fungos isolados, dificultam o estabelecimento da diversidade e distribuição dos fungos associados aos macrorganismos.

Recentemente, MENEZES *et al.* (2010) apresentaram resultados quanto à diversidade microbiana de organismos marinhos coletados na costa do estado de São Paulo. Com a utilização de ferramentas moleculares (ARDRA - Análise de restrição de DNA ribossomal amplificado), foi possível a identificação de 144 biotipos distintos de 256 isolados de fungos marinhos, sendo que os fungos filamentosos distribuíram-se entre 24 diferentes gêneros pertencentes a Ascomicetos, Zigomicetos, Basidiomicetos, muitos deles nunca relatados (*Pestalotiopsis*, *Xylaria*, *Botryosphaeria* e *Cunninghamella*, Figura 2).

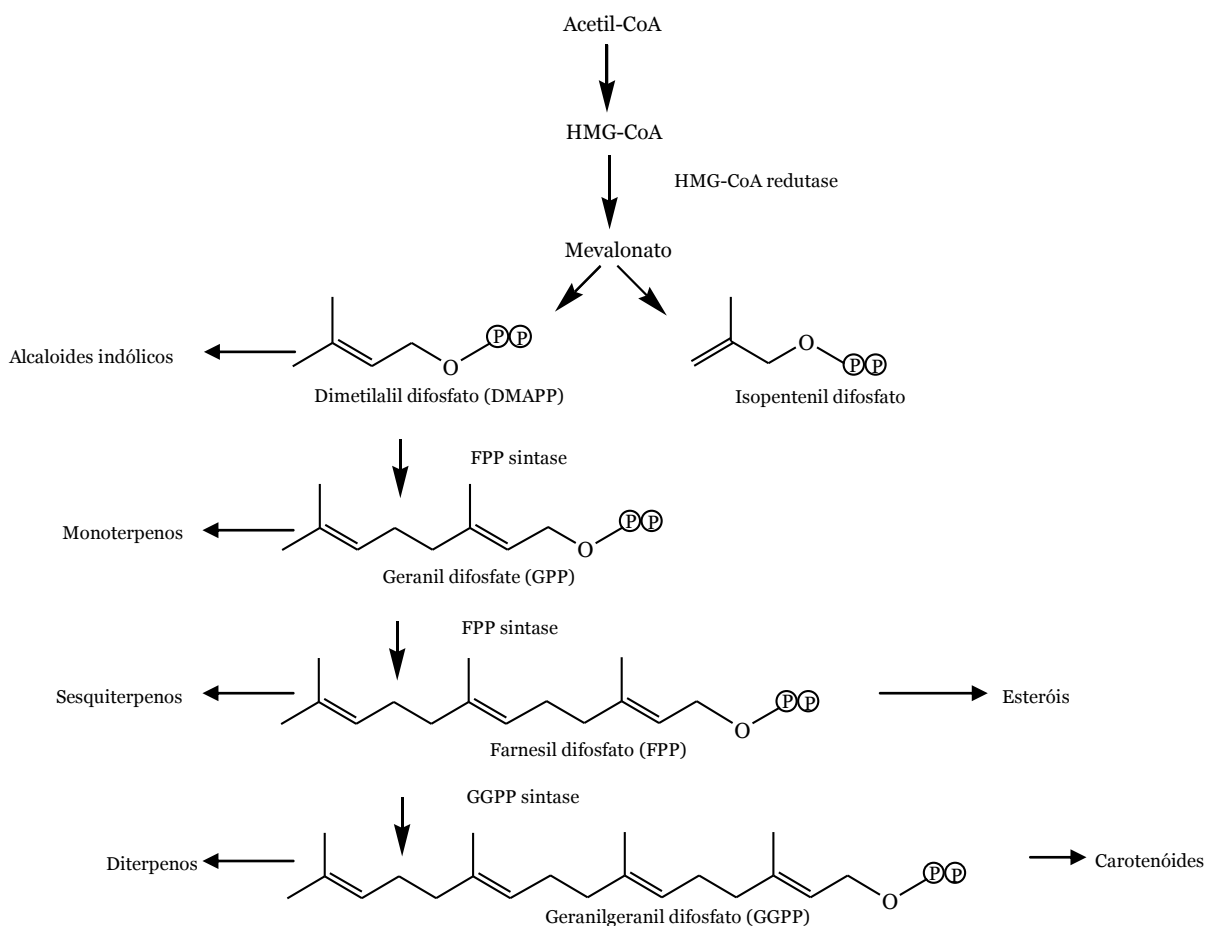


**Figura 2.** Ocorrência de fungos filamentosos em amostras de organismos marinhos: ascídia *Didemnum* sp.; esponjas *Mycale laxissima*, *Amphimedon viridis* e *Dragmacidon reticulata* (Adaptado de MENEZES *et al.*, 2010).

No que se refere à química de microrganismos, o descobrimento da penicilina, isolada dos fungos *Penicillium notatum* e *P. chrysogenum*, em 1929 foi o passo inicial para o início das pesquisas de metabólitos ativos, porém o real interesse nesta substância como potencial antibiótico deu-se somente na década de 40, quando reduziu em 10 vezes o número de mortalidade no período entre a Primeira e a Segunda Guerra Mundial (BUGNI e IRELAND, 2004; BUTLER, 2004; TAKAHASHI e LUCAS, 2008). Desde então, os fungos terrestres têm sido fonte de classes de metabólitos como cefalosporinas, ciclosporinas, griseofulvinas (PIETRA, 1997), sendo superados somente pelos Actinomicetos. Atualmente, a pesquisa quanto ao potencial dos fungos de origem marinha excedem as de fungos de origem terrestre, pois se acredita que representam uma fonte alternativa para o isolamento de novos metabólitos ativos (EFFENDI, 2004).

A produção de metabólitos secundários por fungos em geral envolve enzimas que não são usadas no crescimento e frequentemente começa quando o crescimento cessa. Em fermentação, o período no qual existe a produção dos metabólitos secundários é denominado idiófase, que ocorre em seguida do período de crescimento, denominado trofófase (BENTLEY e BENNETT, 1988).

A descrição completa do metabolismo secundário de microrganismos pode requerer conhecimento de (1) precursores dos metabólitos primários dos quais são derivados, (2) os intermediários ao longo da rota, (3) a genética e a enzimologia de cada reação, e (4) o processo regulatório (BENTLEY e BENNETT, 1988). Pigmentos, toxinas e outros metabólitos secundários de basidiomicetos, líquens e outros fungos escleróticos são aceitos como características constantes e parte da maquinaria constitutiva, considerados muitas vezes marcadores metabólicos. O maior precursor de metabólitos secundários de fungos é a Acetil-CoA, levando a formação de policetídeos, terpenos, esteróides e metabólitos derivados de ácidos graxos (Figura 3). Outros metabólitos secundários são derivados de intermediários da rota do ácido chiquímico, ciclo do ácido carboxílico e de aminoácidos (EFFENDI, 2004).



**Figura 3.** Rota biosintética dos metabólitos secundários de fungos. Dimetilalil difosfato (DMAPP), produto da rota do mevalonato, derivado da Acetil-CoA, é construído por blocos de 5 unidades isoprenóides que são precursores de

esteróides, carotenóides e coenzimas em muitas espécies. Uma família de isoprenil difosfato sintases é responsável pelo alongamento das cadeias. DMAPP e seus intermediários são precursores de uma gama de metabólitos secundários, incluindo alcalóides indólicos, monoterpenos, sesquiterpenos e diterpenos (adaptado de KELLER *et al.*, 2005).

Pouco é conhecido sobre as funções que os metabólitos podem desempenhar para os organismos dos quais se originaram. Frequentemente existe uma correlação próxima entre a produção de metabólitos secundários e diferenciação na cultura líquida, ou seja, somente em simbiose estes microrganismos produzem compostos diferenciados (GLOER, 2007; PROKSCH *et al.*, 2008).

Fungos, em sua grande maioria isolados de esponjas, são fontes renováveis, para produção de metabólitos, e a obtenção em grande escala de importantes produtos pode ser realizada (TAYLOR *et al.*, 2004). Modificações da estrutura dos metabólitos e aumento da eficiência da produção podem ser realizadas através de mutações de isolados, variações de meio e otimização de culturas (GLOER, 2007).

MIAO *et al.* (2006) demonstraram os efeitos das condições dos meios de cultivo e cultivo competitivo com bactérias no crescimento micelial, perfil metabólico, e atividade antibacteriana do fungo marinho *Arthrimum c.f. saccharicola*. O fungo cresceu mais rapidamente em meio com alta fonte de nitrogênio (0,5% de peptona e/ou extrato de levedura), enquanto exibiu maior atividade em meio com alta concentração de fonte de carbono (2% de glicose). Outros fatores observados foram o maior crescimento do fungo a 30°C em pH 6.5 e água sem adição de sal, enquanto que exibiu alta atividade antibacteriana a 25°C em pH 4.5, 5.5 e 7.5 com 34 ppt de sal no meio. Os resultados demonstraram diferenças claras nas condições ótimas para o crescimento micelial e bioatividade do fungo.

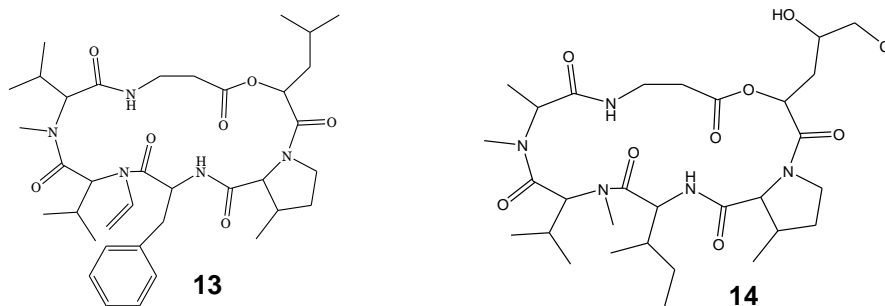
Segundo KELECOM (2002) 56% das substâncias isoladas de fungos marinhos são compostos nitrogenados, 30% são metabólitos derivados do acetato e 13% terpenóides, 13% compostos sulfurados, 8% halogenados, sendo predominantemente cloretos. Entre as principais classes de metabólitos encontradas estão dicetopiperazinas, sesquiterpenos, policetídeos, compostos nitrogenados (alcalóides e peptídeos) e clorolactonas (KELECOM, 2002; SALEEM *et al.*, 2007). O primeiro relato do isolamento de metabólitos de fungos associados a esponja é

datado de 1993, onde o policetídeo trichoharzina foi isolado do fungo *Trichoderma harzanium* associado a esponja *Mycale cecilia* (BIABANI e LAATSCH, 1998).

Considerando o grande número de substâncias isoladas dos fungos marinhos, sabe-se que cerca de 70-80% apresentam atividades biológicas (FAULKNER, 2001; FAULKNER, 2002), principalmente, atividade antibiótica e antitumoral (PIETRA, 1997; BUGNI e IRELAND, 2004; BLUNT *et al.*, 2004; MAYER e HAMANN, 2005, BHADURY *et al.*, 2006; BLUNT *et al.*, 2007). Também são relatadas as atividades de inibição do ciclo celular, inibição da fosfatase/quinase, antiviral, antioxidante, antiinflamatória e antiprotozoária (KELECOM, 2002; BLUNT *et al.*, 2004; BUGNI e IRELAND, 2004; MAYER e HAMANN, 2005; BLUNT *et al.*, 2006, 2007, 2011).

O estudo da química de microrganismos marinhos no Brasil iniciou-se em São Paulo em 1999 com o isolamento de três actinomicetos e um fungo, *Scolecobasidium arenarium*, de sedimentos marinhos. Extratos orgânicos revelaram a presença de um derivado de aminoácido intimamente relacionado com derivados de acil-homoserinolactonas (BERLINCK *et al.*, 2004).

Como exemplo das pesquisas realizadas em nosso país, LIRA *et al.* (2006) isolaram 7 ciclodepsipeptídeos, entre elas as inéditas pseudodestruixina C (**13**) e  $\beta$ -Me-Pro destruxina E clorohidrina (**14**). A fonte para o isolamento destas moléculas foi o fungo *Beauveria felina*, presente na alga *Caulerpa* sp., coletada na Praia do Cabelo Gordo de Fora/SP. Este mesmo grupo de pesquisa, em estudos complementares, isolou 57 fungos de sedimentos marinhos, algas, esponja e anêmona. Entre as espécies isoladas, 8 pertenciam ao gênero *Penicillium*, 5 ao gênero *Verticillium*, 2 *Aspergillus* e 2 *Phoma*. O objetivo dos pesquisadores neste estudo, porém, foi avaliar o potencial dos metabólitos secundários destes fungos frente a bactérias gram-positivas e gram-negativas, incluindo *Mycobacterium tuberculosis*, levedura, atividade anti-leishmania e citotóxica (VITA-MARQUES *et al.*, 2008).



Além dos estudos de isolamento e identificação de novas moléculas bioativas, ROCHA *et al.* (2009) apresentam reações de biotransformação de  $\alpha$ -bromoacetofenonas pelo fungo marinho *Aspergillus sydowii* isolado da esponja *Chelonaplysylla erecta* (São Paulo). Neste estudo, as células do fungo, em meio de cultivo específico, foram capazes de catalisar a biotransformação de 1 para 2-bromo-1-feniletanol (rendimento de 56%), juntamente com  $\alpha$ -clorohidrina (9%), 1-feniletan-1,2-diol (26%), acetofenona (4%) e feniletanol (5%).

Considerando os trabalhos no tema, esta tese objetiva o estudo de fungos marinhos derivados de organismos da costa do estado de Santa Catarina, visando contribuir com as pesquisas no âmbito da química, ainda escassos no Brasil. Também destacamos como relevante o enfoque da investigação de substâncias que apresentem atividade antibiofilme e/ou antibiótica e antiparasitária, principalmente na busca de novos alvos e/ou mecanismos de ação.

### III. 4 Resistência Bacteriana & Biofilmes Patogênicos

As doenças de origem infecciosa estão entre as principais causas mundiais de óbitos (FAUCI, 2001; SPELLBERG *et al.*, 2004). Observa-se que as infecções de origem bacteriana contribuem substancialmente com esta alta taxa de mortalidade (RASKO e SPERANDIO, 2010) e infecções causadas por microrganismos multiresistentes são um desafio diário aos clínicos em todo o mundo. O surgimento de bactérias resistentes a antibióticos pode ser considerado como uma manifestação natural regida pelo princípio evolutivo da adaptação genética de organismos a mudanças no seu meio ambiente (SILVEIRA *et al.*, 2006; SPELLBERG *et al.*, 2008).

Resistência bacteriana é um dos maiores desafios de saúde pública global desde o uso da penicilina nos anos 40, obrigando as indústrias farmacêuticas a

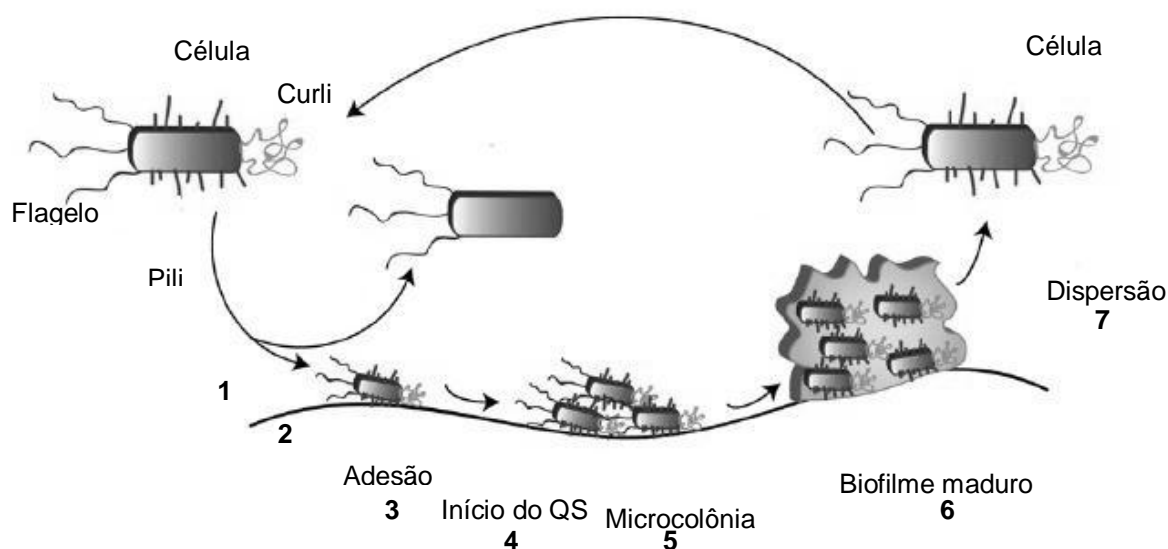
desenvolverem novas estratégias de combate a infecções bacterianas emergentes. Muitas bactérias apresentam, de forma intrínseca, resistência a mais de uma classe de agentes antimicrobianos. Alguns dos mecanismos que as bactérias possuem para driblar e resistir ao ataque dos antibióticos são: (a) aquisição de genes codificadores de enzimas que podem degradar ou modificar quimicamente o antibiótico levando a inativação, (b) bombas de efluxo fazendo com que ocorra expulsão do antibiótico pela célula antes que atinja o alvo e (c) mudança de permeabilidade da membrana pela aquisição de genes ou mutações que limitam o acesso do agente ao alvo via *downregulation* dos genes de porinas (TENOVER, 2006; SALMOND e WELCH, 2008). Desta forma, a exploração de novas fontes para o isolamento de moléculas que sejam capazes de reverter algumas destas situações são necessárias.

Fatores essenciais para sobrevivência das bactérias e combate aos fatores de virulência capazes de impedir o desenvolvimento das patologias são opções atrativas como potenciais alvos na investigação de novos agentes antibacterianos (BARCZACK e HUNG, 2009; HETT e HUNG, 2009). Porém, no combate aos fatores de virulência, os agentes anti-virulência precisam possuir características de propensão reduzida à seleção de resistência (inibição de rotas ou alvos afetando funções essenciais para interação patógeno-hospedeiro – diminuição de pressão seletiva) e agir em alvos específicos (preservação da flora constitutiva do hospedeiro) (ALEKSHUN e LEVY, 2004; CLATWORTHY *et al.*, 2007; ESCAICH, 2008; BARCZACK e HUNG, 2009), o que são vantagens sobre os agentes antibacterianos já existentes.

Entre os principais fatores de virulência e possíveis alvos terapêuticos estão: sistemas de secreção bacteriano; produção de toxinas (inibição da transcrição); inibição de defesas bacterianas contra o organismo hospedeiro; inibição da adesão (pili ou fímbrias em bactérias gram-negativas e sortases, em gram-positivas); sinalização célula-célula (sistema *quorum-sensing*) e formação de biofilmes (ESCAICH, 2008; BARZACK e HUNG, 2009; RASKO e SPERANDIO, 2010). Entre estes fatores de virulência citados, a formação de biofilmes e o sistema *quorum-sensing* serão abordados.



Biofilmes são complexas comunidades de bactérias embebidas em uma matriz polimérica composta por polissacarídeos, proteínas e ácidos nucleicos (EPS) (HETT e HUNG, 2009). A formação de biofilmes é um processo dinâmico que compreende diversas etapas (Figura 4): 1) pré-condicionamento da superfície de adesão por macromoléculas presentes no ambiente que a rodeia; 2) transporte de células planctônicas do ambiente circundante à superfície; 3) adesão de células na superfície biótica ou abiótica; 4) migração das células formando microcolônias com produção de moléculas sinalizadoras – sistema *quorum-sensing*; 5) produção de material exopolimérico, resultando na formação da matriz – macrocolônias; 6) transporte de substratos e produtos para dentro e para fora do biofilme - maturação; 7) desprendimento de células do biofilme para encontrar condições mais favoráveis ao seu crescimento após mudanças nas condições ambientais iniciais ou por motivo de programação celular (O'TOOLE *et al.*, 2000; SIMÕES *et al.*, 2009).



**Figura 4.** Estágios do ciclo de vida de um biofilme. Principais etapas relacionadas: 1- pré-condicionamento da superfície de adesão; 2- transporte de células planctônicas à superfície 3- adesão das células planctônicas; 4 e 5- formação de microcolônia (*quorum-sensing*); 6- produção de matriz exopolimérica (EPS); 7- desprendimento das células e início de um novo ciclo (Adaptado de HETT e HUNG, 2009).

Relata-se que, de todas as infecções humanas, 80% podem estar associadas a biofilmes (NIH, 1999). Outro fator importante a ser observado é que

bactérias quando em biofilme, possuem de 10-1000 vezes mais resistência aos efeitos dos agentes antimicrobianos do que quando encontradas em sua forma planctônica e os custos de doenças associadas a infecções por biofilmes ultrapassam 1 bilhão de dólares anualmente. Infecções relacionadas a fibrose cística (*Pseudomonas aeruginosa*), bem como infecções relacionadas a implantes médicos (*Staphylococcus epidermidis*) são exemplos típicos destes tipos de infecções onde os biofilmes estão presentes (COSTERTON, 1999; MAH e O'TOOLE, 2001; DAVIES, 2003).

A reduzida susceptibilidade a antimicrobianos apresentada pelas bactérias quando estão na forma de biofilmes deve-se a fatores como o lento crescimento bacteriano; alteração do microambiente (depleção de nutrientes e oxigênio); baixa penetração dos antibióticos (alteração dos alvos, expressão de bombas de efluxo e enzimas degradadoras ou neutralizadoras) e respostas adaptativas, além do possível desenvolvimento de células *persisters*, ou seja, células que não apresentam crescimento e nem morrem na presença de antibióticos (MAH e O'TOOLE, 2001; STEWART *et al.*, 2001; STEWART, 2002; DAVIES, 2003; HETT e HUNG, 2009; HOIBY *et al.*, 2010).

Entre as etapas principais de formação de um biofilme bacteriano, está a adesão bacteriana onde a bactéria irá colonizar o hospedeiro e promover a infecção. As bactérias quando encontram superfície favorável (biótica ou abiótica) para a sua adesão utilizam diversos tipos de apêndices como pili, fimbrias ou flagelos e adesinas que medeiam a interação com os receptores do hospedeiro; e forças físico-químicas como ligações de Van-der-Waals, interações ácido-base, eletrostáticas e hidrofóbicas, para que ocorra esta adesão (KATSIKOGIANNI e MISSIRLIS, 2004).

A inibição da adesão celular bacteriana a substratos abióticos pode ser obtida por modificação da superfície de um biomaterial tanto física como quimicamente (BAVEJA *et al.*, 2004). O recobrimento de superfícies utilizando moléculas inibidoras de *quorum-sensing*, antisépticos, antimicrobianos são alternativas interessantes e empregadas atualmente (BAVEJA *et al.*, 2004; TIMSIT *et al.*, 2011). Outro exemplo é a inserção de modificadores de superfície em poliuretano e modificações hidrofílicas, hidrofóbicas, aniônicas ou catiônicas de biomateriais para interferir na adesão celular

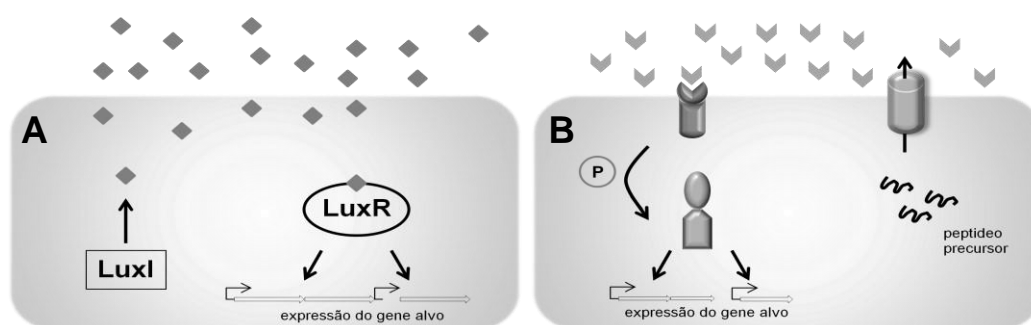
bacteriana (CHANDRA *et al.*, 2005). Considerando superfícies bióticas, a terapia antivirulência é citada, onde os compostos são capazes de interferir na expressão dos fatores de virulência, sem ocorrer o desenvolvimento do mecanismo de resistência como no caso dos antibióticos (CLATWORTHY *et al.*, 2007). A exemplo disto está a inibição de sortases por produtos naturais. As sortases são reconhecidos fatores de virulência de bactérias gram-positivas e estão diretamente envolvidos com a ancoragem do pili à parede celular da bactéria (MARESSO e SCHNEEWIND, 2008).

Outro fator importante, fundamental ao crescimento e desenvolvimento de biofilmes bacterianos, são os eventos de sinalização (*quorum-sensing*). O sistema *quorum-sensing* é responsável pela regulação de fenótipos em bactérias gram-positivas e gram-negativas, incluindo produção de antibióticos, desenvolvimento de corpo frutificante e esporulação. Este sistema de sinalização também é requerido para a virulência apresentada por vários microrganismos patogênicos, incluindo *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus* entre outros (DIGGLE *et al.*, 2007).

A comunicação bacteriana célula-célula é um fenômeno pelo qual pequenas moléculas sinalizadoras detectam a densidade celular do meio em que se encontram e coordenam uma resposta de acordo com a necessidade da população bacteriana (DIGGLE *et al.*, 2007). Essas moléculas sinalizadoras são chamadas de autoindutoras (AI) e podem variar entre bactérias gram-positivas e gram-negativas (Figura 5) (OTTO, 2004; WATERS e BASSLER, 2005; MARTIN *et al.*, 2008).

As moléculas AI envolvidas na comunicação intraespecífica em bactérias gram-negativas são *N*-acilhomoserinolactonas ou autoindutor-1 (AHL OU AI-1; Tabela 2). O microrganismo patogênico modelo para estudos de *quorum-sensing* em bactérias gram-negativas é *Pseudomonas aeruginosa*, onde o *quorum-sensing* é essencial para o desenvolvimento de, por exemplo, infecção pulmonar crônica. Uma vez que controla a adesão, formação de biofilme e a expressão de fatores de virulência, que leva à persistência da infecção, leva muitas vezes ao desenvolvimento de fibrose cística (WHITEHEAD *et al.*, 2001; WATERS e BASSLER, 2005; MARTIN *et al.*, 2008; HOIBY *et al.*, 2010). O sistema de

sinalização destes microrganismos é realizado por proteínas tipo *LuxI* que são responsáveis pela produção dos AHL que, em *Pseudomonas aeruginosa* envolve dois sistemas análogos *LasI/R* e *RhlI/R*, sendo estes auto-regulados e intimamente conectados formando uma cascata regulatória (O'TOOLE *et al*, 2000; O'TOOLE, 2003; WHITEHEAD *et al.*, 2001; FEDERLE e BASSLER, 2003; VENTURI, 2006). Uma vez produzidos, os AHL se difundem livremente pela membrana celular e, atingindo altas concentrações extracelulares, o receptor citoplasmático LuxR ativa a transcrição para expressão dos genes alvo (WATERS e BASSLER, 2005).

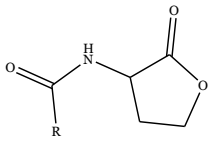
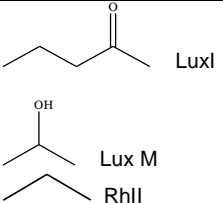
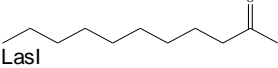
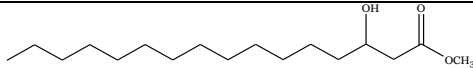
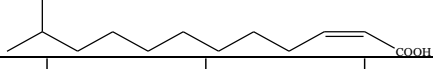
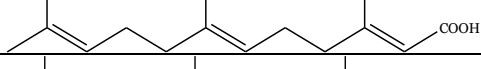
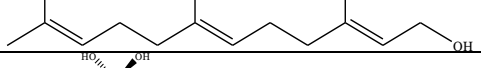
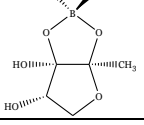
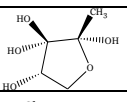
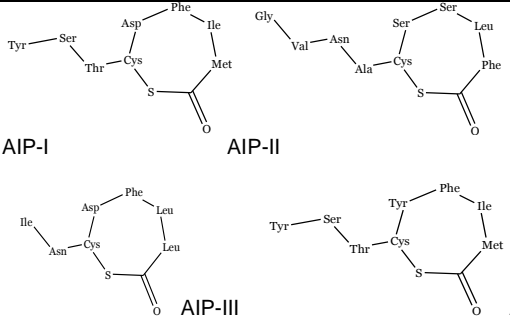
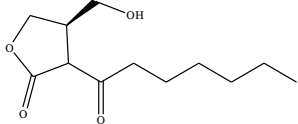


**Figura 5.** Representação do sistema *quorum-sensing*. **(A)** Bactérias gram-negativas: sistema LuxI/R onde a síntese do autoindutor AHL (◆) é catalizado por LuxI e liga-se a proteína LuxR coordenando a expressão dos genes alvo; **(B)** Bactérias gram-positivas: sistema de 2 componentes AIP, onde peptídeos clivados e modificados são transportados para o meio extracelular (▼) e recaptados por sensor histidina-quinase, reconhecidas por receptores cognato reguladores da expressão gênica (Adaptado de TAGA e BASSLER, 2003).

Considerando bactérias gram-positivas, o sistema de comunicação é mediado por peptídeos cíclicos autoindutores (AIPs; Tabela 2), tipicamente composto por 5-17 aminoácidos, com raras modificações em suas cadeias laterais (OTTO, 2004). O sistema *quorum-sensing* dessas bactérias é realizado através de um sistema de 2 componentes mediado por uma cascata de fosforilação/desfosforilação. Os AIPs são clivados, modificados e exportados, por receptores dedicados, ao meio extracelular. Em sequência, um sensor de membrana de 2 componentes histidina-quinase detecta as moléculas sinalizadoras, iniciando uma série de fosforilações até atingir os receptores cognato reguladores, onde inicia-se a transcrição para expressão de genes alvo (MILLER e BASSLER, 2001; READING e SPERANDIO, 2006). Um dos

mais estudados sistemas *quorum-sensing* de bactérias gram-positivas, principalmente *Staphylococcus aureus* é o sistema *agr* (gene regulador acessório) que regula entre outros fatores, secreção de toxinas e proteases e desprendimento do biofilme em *Staphylococcus aureus* (READING e SPERANDIO, 2006; BOLES e HORSWILL, 2008).

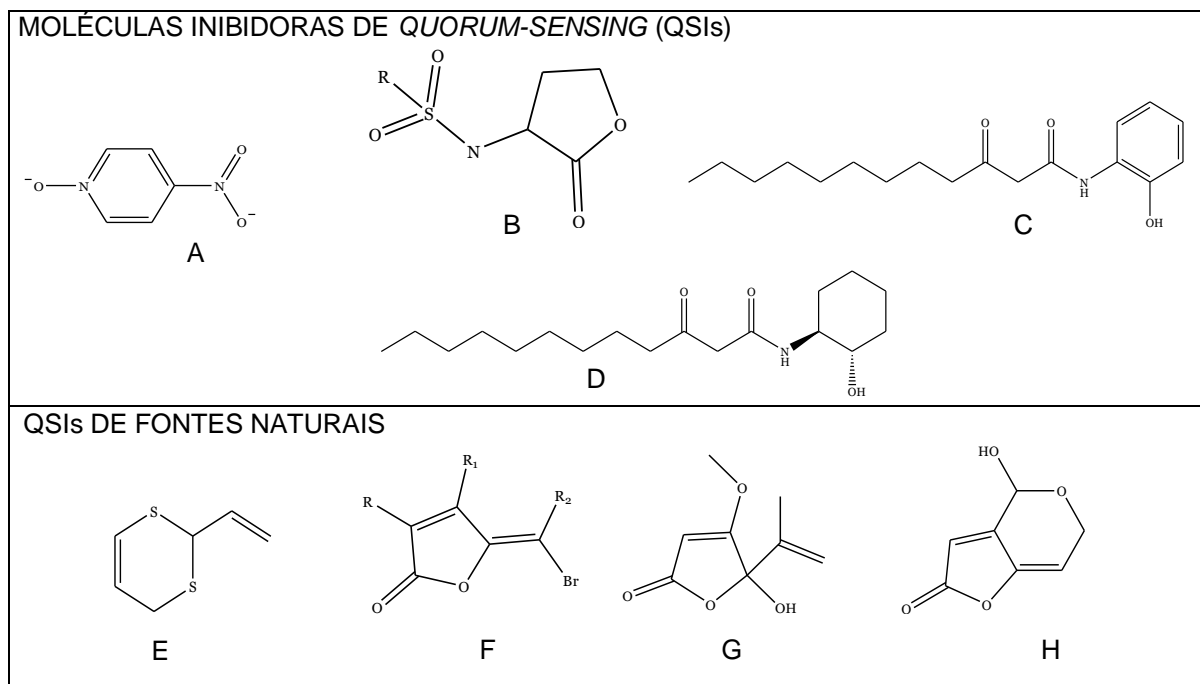
**Tabela 2.** Exemplos de sinalizadores *quorum-sensing* microbianos (Adaptado, WATERS e BASSLER, 2005).

Sistema <i>quorum-sensing</i>	Estrutura sinalizadora	Organismos representantes
Acilhomoserino lactonas (AHLs)		<i>Vibrio fischeri</i> <i>Agrobacterium tumefaciens</i> (homólogo) <i>Vibrio harveyi</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Burkholderia cepacia</i> <i>Erwinia carotovora</i>
	Estrutura básica	
		
		
3OH ácido palmítico metil ester (PAME)		<i>Ralstonia solanacearum</i>
DSF		<i>Xanthomonas campestris</i>
Ácido farnesóico		<i>Candida albicans</i>
Farnesol		<i>C. albicans</i>
AI-2 (S-THMF-borato)		<i>Vibrio harvey</i>
AI-2 (R-THMF)		<i>Salmonella typhimurium</i>
Oligopeptídeo autoindutor (AIP)	 <p>AIP-I      AIP-II</p> <p>AIP-III      AIP-IV</p>	<i>Staphylococcus aureus</i>
Oligopeptídeo autoindutor	ADPITRQWGD    Com X	<i>Bacillus subtilis</i>
	ERMGT    CSF	<i>B. subtilis</i>
	EMRLSKFFRDFILQRKK    CSP	<i>Streptococcus pneumoniae</i>
Streptomyces $\gamma$ -butirilactonas		<i>S. griseus</i>

Além destes sistemas sinalizadores intraespecíficos supracitados, existe um sistema de comunicação interespecífica, presente em bactérias gram-positivas e gram-negativas, os sinalizadores furanosil diester borato ou autoindutor-2 (AI-2) (FEDERLE e BASSLER, 2004; SIMÕES *et al.*, 2009). Acredita-se que este AI-2 seja amplamente distribuído na natureza e é diferente dos outros AIs conhecidos, compondo a terceira maior categoria de autoindutores. Esta substância é produzida e reconhecida por uma grande quantidade de bactérias, sugerindo que esta seja a primeira molécula descrita que facilita a comunicação entre diferentes espécies bacterianas (FEDERLE e BASSLER, 2004; WATERS e BASSLER, 2005).

Muitas bactérias produtoras de AI-2 também produzem AI-1 ou AIPs, indicando que possuem mecanismos próprios de reconhecimento de densidade celular para ativação de cada mecanismo. Outro sistema de comunicação existente é AI-3, sensor de membrana histidina/quinase (QseC). Muitas bactérias patogênicas reconhecem o meio do hospedeiro sensorialmente e respondem ao sistema adrenérgico sinalizado por moléculas de epinefrina e norepinefrina. Esses patógenos parecem usar o sensor de membrana para reconhecer sinais adrenérgicos do hospedeiro e sinais aromáticos autoindutores para ativar seus genes de virulência (RASKO *et al.*, 2008). Este sistema está presente principalmente em *Escherichia coli* enterohemorrágica, representando um sistema de comunicação inter-reino, células eucarióticas e procarióticas (CLARKE *et al.*, 2006).

A interceptação de sinais *quorum-sensing* ocorre após a adesão bacteriana a fim de inibir a produção da matriz exopolissacarídica, com utilização de inibidores de *quorum-sensing* (QSI). Pequenas moléculas QSI estão sendo identificadas com a utilização de *High-Throughput Screening* (HTS) e bibliotecas estão sendo construídas, onde são depositadas também moléculas antagonistas construídas com ferramentas de modelagem molecular (RASKO e SPERANDIO, 2010) (Figura 6). Estes compostos podem constituir uma nova geração de agentes antimicrobianos com aplicação em muitos campos, incluindo medicina, agricultura e aquacultura.



**Figura 6.** Moléculas inibidoras de *quorum-sensing* (A) 4-NPO; (B) análogo de AHL com um grupo sulfonil em substituição do grupo carbonila; (C) 3-oxo-C12-(2-aminofenol), antagonista de QS em *P. aeruginosa*; (D) agonista QS 3-oxo-C12-(2-aminociclohexanol); (E) composto cíclico sulfurado, isolado do alho; (F) estrutura básica de furanona halogenada isolada de *Delisea pulchra* – R1 e R2 podem ser H ou Br; (G) ácido penicílico e; (H) patulina, produzida por espécies de *Penicillium* (Adaptado de RASMUSSEN e GIVSKOV, 2006).

Esta interceptação também pode ocorrer por (i) inibição da geração do sinal AHL, (ii) inibição da disseminação do sinal AHL e (iii) inibição da recepção do sinal AHL (HENTZER e GIVSKOV, 2003; RASMUSSEN e GIVSKOV, 2006). O isolamento de furanonas halogenadas da alga vermelha marinha *Delisea pulchra* (KJELLEBERG *et al.* 1997), estimulou a investigação de produtos naturais com a propriedade de interceptar sinais *quorum-sensing* e prevenir a colonização microbiana (CEGELSKI *et al.*, 2008). Estas furanonas possuem grande similaridade estrutural com as AHL, realizando a inibição destes sinalizadores *quorum-sensing* em nível de LuxR, controlando a colonização de superfícies (MANEFIELD *et al.*, 1999). A utilização de enzimas (AHL-lactonases, AHL-acilases e paraoxonases) que bloqueiam a geração, acumulação ou recepção do sinal *quorum-sensing*, designadas *quorum-quenching*, também estão sendo reveladas (DONG *et al.*, 2007).

Face ao exposto, a identificação de estratégias naturais ou desenvolvimento de estratégias sintéticas que venham a interferir na formação de biofilmes são

necessários, seja no processo de adesão celular, na comunicação celular intra e interespecífica ou na desintegração da matriz formadora de biofilmes. Levando em consideração que biofilmes são os principais fatores causadores de resistência bacteriana, pesquisadores têm empenhado seus esforços na busca por novas moléculas ou mecanismos que venham a reverter ou impedir esse processo. Até o momento, não existem medicamentos disponíveis na terapia ou em estudos clínicos avançados específicos para eliminação de biofilmes patogênicos, e sim a utilização dos medicamentos antibacterianos em mono ou politerapia. Tratando-se de agentes antimicrobianos, somente 8 medicamentos antimicrobianos estão sendo desenvolvidos pelas 15 maiores indústrias farmacêuticas enquanto somente 1 agente antimicrobiano está em desenvolvimento entre as 7 maiores empresas biotecnológicas (SPELLBERG *et al.* 2004).

### III. 5 Antiparasitários: *Trichomonas vaginalis*

*Trichomonas vaginalis* é o protozoário flagelado causador da tricomonose (KASSAI *et al.* 1988). As manifestações clínicas da doença ocorre diferentemente em homens e mulheres. Em homens, na maioria dos casos relatados, a doença é assintomática, muitas vezes autolimitada. Quando sintomática, as queixas escassas são devido a corrimentos mucopurulentos, disúria e pouco prurido ou ardência imediatamente após a relação sexual (PETRIN *et al.*, 1998).

Por outro lado, em mulheres, as manifestações clínicas iniciam-se com prurido local com corrimento vaginal espumoso, amarelo ou esverdeado e mucopurulento, dor abdominal baixa e disúria atingindo até um estado de severa vaginite (PETRIN *et al.*, 1998; FICHOROVA, 2009). Além disso, a tricomonose pode causar sérias consequências de saúde, como complicações na gravidez (KLEBANOFF *et al.*, 2001), infertilidade (GRODSTEIN *et al.*, 1993), predisposição ao câncer cervical (VIAKKI *et al.*, 2000), doença inflamatória pélvica (CHERPES *et al.*, 2006), parto prematuro e baixo peso do bebê ao nascer (COTCH *et al.*, 1991; 1997) e facilita a transmissão do vírus HIV em até 2 vezes e, conseqüentemente à ocorrência da SIDA (SORVILLO e KERNDT, 1998; SORVILLO *et al.*, 2001).

Atualmente, a terapia medicamentosa utilizada no tratamento da tricomonose compreende fármacos da classe dos 5-nitroimidazóis. Entre os representantes,



metronidazol, desenvolvido e aprovado em meados da década de 60, é o medicamento de escolha para esta infecção. Somente em 2004, tinidazol foi aprovado para o uso em virtude do aparecimento de isolados resistentes (CUDMORE *et al.*, 2004).

Outros agentes quimioterápicos já foram e vem sendo estudados *in vitro* como o composto nitazoxanida. Este, apresentou atividade 5 vezes mais pronunciada que o metronidazol contra isolados sensíveis e resistentes (ADAGU *et al.* 2002). Diaminas lipofílicas, recentemente, revelaram atividade anti-*T. vaginalis* (GIORDANI *et al.*, 2009).

Tratando-se de produtos naturais, pesquisas utilizando compostos isolados de plantas, como fontes alternativas, foram desenvolvidas. Estudos recentes foram realizados com alcalóides isolados de plantas da família Amaryllidacea, frações enriquecidas de saponinas de plantas do gênero *Quillaja*, *Passiflora* e *Ilex* e extratos de *Polygala decumbens* (FRASSON *et al.*, 2011; GIORDANI *et al.*, 2010; 2011; ROCHA *et al.*, 2012). No contexto de produtos naturais, metabólitos produzidos por microrganismos foram relatados como ativos contra *T. vaginalis* e outras doenças parasitárias (PRAY, 1952; PIMENTEL-ELARDO *et al.*, 2010; GAO *et al.*, 2011) porém quanto a metabólitos produzidos por fungos marinhos contra *T. vaginalis*, nenhum estudo foi relatado.

Diante da revisão apresentada, podemos entender que a busca de alternativas terapêuticas para o combate a bactérias patogênicas, principalmente quando ocorrem na forma de biofilmes e parasitos, como o *T. vaginalis*, tornou-se nos últimos anos uma preocupação global. O desenvolvimento de resistência medicamentosa tanto por bactérias quanto por parasitos e a ausência de novas terapias para o tratamento das infecções são agravantes.

O descobrimento de novos e potenciais alvos patógeno-específicos possibilitaria a minimização, dos efeitos adversos pela possibilidade de diminuição da dosagem de antimicrobianos administrados (de co-administração com substâncias não bactericidas) que prejudicam principalmente a flora comensal humana, além de evitar o surgimento de resistência microbiana. Com isso, a

investigação de fontes de novas moléculas, como os fungos marinhos, abre a perspectiva do isolamento de substâncias capazes de intervir nestes processos.



---

**IV. Artigo 1. Sponge-associated fungi from South Brazilian Coast produce metabolites with remarkable antibiofilm and antibiotic activities**

***A ser submetido a *Bioresource Technology****



**Sponge-associated fungi from South Brazilian Coast produce metabolites with remarkable antibiofilm and antibiotic activities**

Marina Scopel<sup>1</sup>, Wolf-Rainer Abraham<sup>3</sup>, Beatriz Mothes<sup>4</sup>, Clea Lerner<sup>4</sup>, Amélia T. Henriques<sup>1</sup>, Alexandre J. Macedo<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Ipiranga, 2752, 90610-000, Porto Alegre, Brazil.

<sup>2</sup>Centro de Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Bento Gonçalves, 43431, 91501-970, Porto Alegre, Brazil.

<sup>3</sup>Helmholtz Centre for Infection Research, Chemical Microbiology, Braunschweig, Germany.

<sup>4</sup>Fundação Zoobotânica do Rio Grande do Sul, Museu de Ciências Naturais, Brazil.

Running head: Fungi from South Brazilian Coast

\*Corresponding author; alexandre.macedo@ufrgs.br, Tel: +55 51 33086082, Fax: +55-51 33087309



Fungi associated to marine organisms are nowadays an important research source due to the recent discovery of new molecules active against diverse pathogenicities. In this study, 39 species of marine organisms were collected in the South Brazilian Coast. From these organisms, 42 fungi were isolated and identified, being 36 fungi belonging to the phylum Ascomycota and one fungi belonging to the phylum Basidiomycota. These fungal strains were distributed among 15 genera in nine orders: Capnodiales (*Cladosporium* and *Ramichloridium*), Pleosporales (*Westerdykella*, *Phoma* and *Alternaria*), Eurotiales (*Penicillium* and *Aspergillus*), Chaetothyriales (*Rhinochrysiella*), Hypocreales (*Hypocrea* and *Simplicillium*), Xylariales (*Eutypella*, *Calonectria* and *Pestalotiopsis*), Trichosphaeriales (*Nigrospora*), Sordariales and, Polyporales (*Polyporus*). Considering the challenged environment that these fungi survive, we search antibacterial and antibiofilm activities of these fungal strains were investigated against clinically relevant biofilm forming, gram-positive (*Staphylococcus epidermidis*) and gram-negative (*Pseudomonas aeruginosa*) bacteria. After fermentation of each fungi for 7, 14 and 21 days we found 27 isolates capable to inhibit or eradicate more than 50% of biofilm. These results show a high potential to produce antibacterial, mainly antibiofilm agents since most of the marine sponges studied herein have never been studied nor fungi was isolated.

**Keywords:** bioprospection; marine associated fungi; *Pseudomonas aeruginosa*; *Staphylococcus epidermidis*; antibiofilm activity.





---

**V. Artigo 2. Mevalonolactone an inhibitor of *Staphylococcus epidermidis*  
adherence and biofilm formation**

**A ser submetido a *International Journal of Antimicrobials Agents***



**Mevalonolactone an inhibitor of *Staphylococcus epidermidis* adherence and biofilm formation**

MARINA SCOPEL<sup>1</sup>, WOLF-RAINER ABRAHAM<sup>2</sup>, ANA LÚCIA ANTUNES<sup>1</sup>, AFONSO L. BARTH<sup>3</sup>, AMÉLIA T. HENRIQUES<sup>1</sup> AND ALEXANDRE J. MACEDO<sup>1,4\*</sup>

<sup>1</sup>Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Ipiranga, 2752, 90610-000, Porto Alegre, Brazil.

<sup>2</sup>Helmholtz Centre for Infection Research, Chemical Microbiology, Braunschweig, Germany.

<sup>3</sup>Unidade de Microbiologia e Biologia Molecular, Serviço de Patologia Clínica, Hospital das Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, Brazil

<sup>4</sup>Centro de Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Bento Gonçalves, 43431, 91501-970, Porto Alegre, Brazil.

\*Corresponding author; alexandre.macedo@ufrgs.br, Tel: +55 51 33086082, Fax: +55-51 33087309.



**Abstract**

*Staphylococcus epidermidis*, commensal microorganism on the human skin and mucous, is nowadays considered an important opportunistic pathogen related to nosocomial infections on indwelling medical devices. *Staphylococcus epidermidis* is well known to develop biofilms on devices, being the main pathogen encountered in the treatment of this infection. In this work we investigate an agent capable to interfere in the adherence and biofilm formation of *S. epidermidis* by natural compounds from marine associated fungi. Mevalonolactone was isolated and identified using spectroscopic and spectrometric data and showed important inhibition of *Staphylococcus epidermidis* biofilm formation evaluated by crystal violet assay and scanning electron microscopy. When tested against 12 clinical isolates of *S. epidermidis* this compound exhibited both biofilm inhibition and antimicrobial activity. Therefore, this molecule seems to be an important agent to interfere with the adhesion and biofilm formation of this pathogen contributing to the arsenal of antibiofilm compounds.

**Key words:** Sordariales, mevalonolactone, *Staphylococcus epidermidis*, biofilm inhibition



---

**VI. Artigo 3. Sponge-associated *Penicillium* sp. produces *cis-cyclo*(leucyl-tyrosyl) dipeptide capable to inhibit *Staphylococcus epidermidis* biofilm formation**

**A ser submetido a *Bioorganic and Medicinal Chemistry***





**Sponge-associated *Penicillium sp.* produces *cis-cyclo*(leucyl-tyrosyl) dipetide capable to inhibit *Staphylococcus epidermidis* biofilm formation**

MARINA SCOPEL<sup>1</sup>, WOLF-RAINER ABRAHAM<sup>3</sup>, AMÉLIA T. HENRIQUES<sup>1</sup> AND ALEXANDRE J. MACEDO<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>Faculdade de Farmácia, Departamento de Produção de Matéria-Prima, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Ipiranga, 2752, 90610-000, Porto Alegre, Brazil.

<sup>2</sup>Centro de Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Bento Gonçalves, 43431, 91501-970, Porto Alegre, Brazil.

<sup>3</sup>Helmholtz Centre for Infection Research, Chemical Microbiology, Braunschweig, Germany.

\*Corresponding author; alexandre.macedo@ufrgs.br, Tel: +55 51 33086082, Fax: +55-51 33087309.



**Abstract**

Infections associated to microbial biofilms are involved in 80% of human infections and became a challenge for public health. Infections related to *Staphylococcus epidermidis* biofilms are commonly associated to medical devices with increasing treatment costs for this type of infection. Alternatives to eliminate this kind of disease have been employed in screening programs using diverse marine-derived fungi as a source of bioactive compounds capable to combat biofilm formation. In this work was isolated the dipeptide *cis-cyclo*(leucyl-tyrosyl) was isolated from *Penicillium* sp. and showed an remarkable , up to 85% of inhibition of biofilm formation without affecting in bacterial growth, as accessed by scanning electron microscopy analysis.

**Key words** *cis-cyclo*(leucyl-tyrosyl), *Staphylococcus epidermidis*, biofilm, marine-derived fungi



---

**VII. Artigo 4. Anti-*Trichomonas vaginalis* activity of marine-associated fungi  
from South Brazilian Coast  
Submetido a *Experimental Parasitology***



**Anti-*Trichomonas vaginalis* activity of marine-associated fungi from South Brazilian Coast**

Marina Scopel<sup>1\*</sup>, Odelta dos Santos<sup>1\*</sup>, Wolf-Rainer Abraham<sup>2</sup>, Tiana Tasca<sup>1</sup>, Amélia T. Henriques<sup>1</sup>, Alexandre José Macedo<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup>Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Ipiranga 2752, 90610-000, Porto Alegre, RS, Brazil.

<sup>2</sup> Helmholtz Centre for Infection Research, Chemical Microbiology, Braunschweig, Germany.

<sup>3</sup>Centro de Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Bento Gonçalves, 43431, 91501-970, Porto Alegre, Brazil

Corresponding author: Tiana Tasca

Address: Av. Ipiranga 2752, 90610-000, Porto Alegre, RS, Brazil.

Tel.: +55 (51) 3308-5325; fax: +55 (51) 3308-5437.

E-mail: tiana.tasca@ufrgs.br

\* Authors contributed equally to this work





## Abstract

*Trichomonas vaginalis* has been known as a cause of trichomonosis, the most common non-viral sexually transmitted disease; the infection with this parasite may bring serious consequences mainly in women's health. Although clinical resistance to metronidazole has been widely reported, the treatment to trichomonosis currently used is based on 5-nitroimidazole drugs. To broaden the spectrum of available compounds, we have selected 42 marine-associated fungi species (126 filtrate samples) to be screened against *T. vaginalis*. Of these, two filtrate samples from isolates belonging to *Hypocrea lixii* and *Penicillium citrinum* showed significant growth inhibitory activity (up to 100%) against *T. vaginalis* (ATCC 30236) and fresh clinical isolates, including a metronidazole-resistant one. The MIC values of the *H. lixii* and *P. citrinum* samples for all isolates tested, including the metronidazole-resistant, were 2.5 mg mL<sup>-1</sup>. The kinetic growth curve showed that the filtrate samples were able to reduce the parasites density to zero in 24 hours of incubation, confirmed by microscopy, and the filtrates did not exhibit hemolytic activity. These data suggest that marine-associated fungi from the South Brazilian Coast may produce compounds for further investigation to treat metronidazole-resistant trichomonosis.

## Keywords

Anti-*Trichomonas vaginalis*, marine-associated fungi, fresh clinical isolates







A descoberta de novos compostos ativos contra infecções microbianas é uma necessidade devido ao alto número de casos de resistência às terapias antimicrobianas existentes em ambiente clínico. Mesmo com intensas pesquisas na busca de novos antibióticos, além de novas substâncias, também novos alvos terapêuticos são foco de muitos grupos de pesquisa, na investigação de alternativas para combater mecanismos de virulência e resistência dos microrganismos patogênicos.

Biofilmes bacterianos, considerados um dos principais fatores de virulência de bactérias e fungos, são 10 a 1000 vezes mais resistentes a antibióticos em comparação às bactérias em vida livre. Um dos grandes desafios da medicina moderna é a remoção total dos biofilmes e das células *persisters*. Células *persisters* são aquelas que estão em estado dormente, que não morrem na presença de agentes bactericidas nem crescem como as outras bactérias dentro do biofilme, caracterizadas pela multitolerância medicamentosa. Com estas observações, a pesquisa e desenvolvimento de novos fármacos bactericidas e/ou que previnam a formação de biofilmes são necessários (LEWIS, 2005).

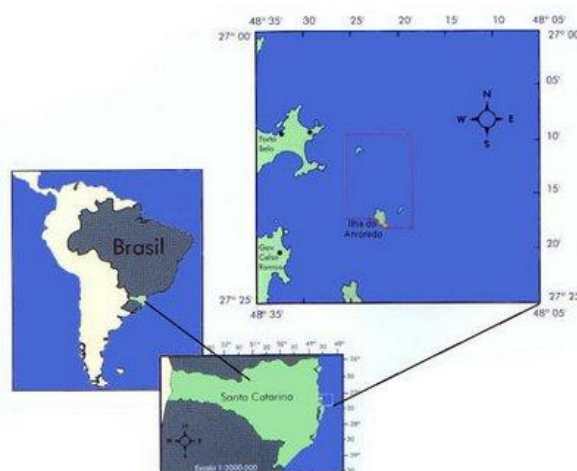
No que diz respeito a pesquisas de agentes anti-*Trichomonas vaginalis*, não é muito intensa quando comparado com outros parasitos como *Trypanosoma*, *Plasmodium* e *Leishmania*. Diante das poucas opções de tratamento para a tricomonose, os fármacos existentes sofrem com o aumento de parasitos resistentes e grande incidência de graves efeitos adversos. Além disso, grande número de casos documentados e o aumento da facilidade na transmissão do vírus HIV torna a busca por novos fármacos atuantes frente a *T. vaginalis* importante.

Fungos isolados de organismos marinhos tem sido objeto de estudos químicos e, as substâncias isoladas participam dos mais diversos ensaios biológicos, como evidenciado nos trabalhos de revisão anuais de FAULKNER *et al.* (2000-2002) e BLUNT *et al.* (2003-2012). Com estes trabalhos é possível observar o aumento crescente do interesse por estes microrganismos marinhos, com um aumento gradual no número de substâncias isoladas, equiparando-se, como observado nos últimos trabalhos de revisão, às substâncias isoladas de esponjas marinhas. Entre os principais ensaios biológicos realizados encontram-se as

atividades antitumoral, antibiótica, antiviral, antioxidante, antiinflamatória, antiprotozoária, entre outras.

Até onde alcançamos verificar, não foram encontrados relatos para avaliação de atividade antibiofilme e anti-*T. vaginalis* utilizando fungos marinhos como fonte de moléculas bioativas, destacando nosso trabalho como pioneiro nesta área. Além disso, a fonte de coleta dos organismos marinhos para o isolamento dos fungos utilizados neste trabalho, ainda é pouco explorada, aumentando a possibilidade de isolamento de fungos inéditos, bem como produção de metabólitos diferenciados.

No ano de 2007, foram coletados os organismos marinhos na Ilha do Arvoredo, pertencente ao conjunto de ilhas da Reserva Biológica Marinha do Arvoredo de Santa Catarina. A ilha do Arvoredo está localizada, aproximadamente 7 km de distância do continente a oeste e 11 km de distância da ilha de Florianópolis (Figura 7). Por abrigar uma biodiversidade de fauna e flora terrestre e marinha, esta reserva faz parte de planos de manejo para a preservação deste ambiente e de diversos estudos ecológicos e científicos (IBAMA, 2004).



**Figura 7.** Localização geográfica da Reserva Biológica Marinha do Arvoredo (Fonte: <http://unidadesdeconservacaodeflorianopolis.wordpress.com>).

Foram coletados 39 organismos marinhos (12 espécies de esponjas, duas ascídias, uma alga e três não-identificados). Muitas das espécies das esponjas coletadas apresentam somente estudos morfológicos, com ausência de pesquisas quanto a química, atividades biológicas ou diversidade de microrganismos. A pesquisa de microrganismos associados à esponjas do mesmo gênero daquelas

coletadas por nosso grupo é relatada por AMAGATA *et al.* (1998). Estes pesquisadores realizaram o isolamento de *Trichoderma harzianum* (*Hypocrea lixii*) associado a esponja *Haliclona okadae*. Outros relatos indicam a presença de espécies de *Penicillium* associados a esponjas *Haliclona angulata* e *Axinella verrucosa* (JADULCO *et al.* 2004; WEI *et al.* 2009) e, recentemente, MENEZES *et al.* (2010) apresentaram resultados de diversidade microbiana das esponjas *Mycale laxissima*, *Amphimedon viridis* e *Dragmacidon reticulata*.

Utilizando 10 meios de cultivo diferentes (em sua grande maioria contendo cloreto de sódio) foi possível isolar 45 fungos. Após o isolamento das espécies, foi selecionado o meio de cultivo Sabouraud, com ausência de sal, para facilitar a manipulação das espécies e observar o crescimento destas em meio não salino. Mesmo com ausência de sal no meio de cultivo e, para muitos dos fungos, disponibilidade de diferentes componentes no meio, houve a viabilidade de 42 espécies, sem alterações morfológicas visuais em um primeiro momento. A classificação destes fungos como facultativos é sugerida pelo crescimento destes em meio não salino, condição esta que é adequada para microrganismos de origem terrestre, de acordo com KOHLMAYER e KOHLMAYER (1979) e MORRISON-GARDINER (2002).

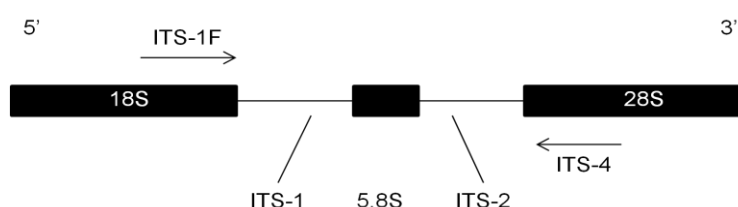
Considerando os organismos marinhos coletados, 59% deles apresentaram fungos associados e, aqueles com maior número foram as esponjas. Também foi observado a presença de maior número de fungos por esponja (9 isolados para a esponja *Axinella corrugata*). BUGNI e IRELAND (2004) também observaram que, do total de fungos isolados em seus estudos, 84% foram encontrados associados a esponjas, seguidos por 7% de ascídias e 2% de algas, o restante foram isolados de organismos marinhos não identificados.

A quantidade de fungos isolados, tanto para uma única espécie como quando considerado o total de fungos isolados foi abaixo do esperado quando comparado aos estudos de WANG *et al.* (2008), onde foram isolados 55 fungos da esponja *Suberites zeteki* e 65 isolados da esponja *Gelliodes fibrosa* ambas coletadas no Hawaii. Ainda, MENEZES *et al.* (2010) isolaram 256 fungos de 3 esponjas e uma ascídia coletadas no litoral de São Paulo. Porém, deve ser considerado que a investigação da diversidade de fungos associados e/ou simbiotes de organismos



marinhos da costa Catarinense ainda é inexplorada e o microambiente em que estes se encontram (baixa poluição, proximidade da costa, presença de correntes marinhas e variações da temperatura da água) pode ser um fator determinante para o número de espécies isoladas. Estas condições determinantes para a presença de fungos no ambiente marinho são relatadas por JONES (2000) indicando que a disponibilidade de substrato para colonização, distribuição geográfica e temperatura, salinidade, competição por inibição, microhabitat, nutrientes orgânicos dissolvidos, concentração de hidrogênio, efeitos osmóticos, disponibilidade de oxigênio, poluentes, abundância de propágulos na água, habilidade de aderir em um substrato, pressão hidrostática, especificidade do substrato, temperatura e luminosidade são fatores que influenciam o crescimento de fungos no mar.

A identificação dos fungos foi realizada utilizando os primers específicos ITS1F e ITS4 que abrangeu a região altamente conservada dos espaçadores ITS1 e ITS2 e o gene 5.8S, situados entre os genes 18S e 28S do DNA ribossomal (Figura 8). A região ITS compreende entre 450 e 700 pares de base e a quantidade de DNA extraído é fundamental para o sucesso do sequenciamento apesar do número de cópias de ITS por célula (BELLEMAIN *et al.*, 2010). Entre os fungos isolados, cinco espécies não apresentaram quantidade suficiente de DNA para realização do PCR mesmo utilizando diferentes técnicas de extração.



**Figura 8.** Representação esquemática da região rDNA com a localização dos primers ITS1F e ITS4 (setas) (Adaptado de BELLEMAIN *et al.*, 2010).

Após a verificação da similaridade das sequências obtidas dos fungos isolados com aquelas presentes no BLAST (NCBI <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>) foi construída uma árvore filogenética. Os dados, referentes aos fungos F05 e F16, não foram incluídos na construção da árvore por apresentarem um baixo número de pares de bases, o que causou interferência no momento de alinhamento das sequências.

Com a construção da árvore filogenética, foram identificadas espécies pertencentes a 15 gêneros em 9 ordens. O gênero *Penicillium* apresentou o maior número de isolados (17%), o que está de acordo com dados registrados na literatura onde este gênero é considerado o mais frequentemente associado a organismos marinhos e no meio terrestre (JENSEN e FENICAL, 2002). Para as espécies identificadas, *Calonectria canadensis*, *Polyporus* sp., *Ramichloridium apiculatum*, *Pestalosphaeria hansenii*, *Eutypella leprosa*, *Simplicillium lanosoniveum* e *Westerdykella purpurea* não foram encontrados relatos de ocorrência em ambiente marinho. Porém outras espécies dos três últimos gêneros foram relatadas. Este fato é importante pois indica a identificação de novas espécies marinhas.

Para avaliação das atividades antibiótica e antibiofilme, foram selecionadas as cepas *S. epidermidis* ATCC 35984 e *P. aeruginosa* ATCC 27853, consideradas bactérias modelo na formação de biofilmes. Para o rastreamento da atividade antibacteriana foram utilizadas 256 amostras (126 extratos orgânicos de micélios e 126 filtrados) e identificadas 19 amostras com halos de inibição superiores a 10 mm.

Inúmeros são os relatos encontrados para atividade antibacteriana de metabólitos de fungos marinhos. Após o descobrimento da cefalosporina C, isolada do fungo marinho *Cephalosporium acremonium* (FAULKNER, 2002), um dos trabalhos pioneiros que avaliou a atividade antibiótica dos metabólitos produzidos pelo fungo marinho *Halocyphina villosa* frente a bactérias gram-positivas, gram-negativas e fungos, foi realizado por KUPKA *et al.* (1981). CUOMO *et al.* (1995) e CHRISTOPHERSEN *et al.* (1998) realizaram o rastreamento para a atividade antibiótica dos metabólitos produzidos por 1500 e 227 fungos marinhos respectivamente, onde 27% destes, em ambos estudos, apresentaram alguma atividade frente a diversos patógenos. Considerando estudos com fungos isolados de organismos marinhos coletados na costa brasileira, cita-se VITA-MARQUES *et al.* (2008) que avaliaram, entre outras, atividade antibacteriana frente à *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Salmonella choleraesuis* ATCC 10708, e à levedura *Candida albicans* ATCC 10231. Entre os 57 isolados de fungos avaliados, somente um apresentou fraca atividade para *P. aeruginosa* e três apresentaram boa inibição da levedura. Estudos mais recentes também são

encontrados, como o rastreamento realizado por WANG *et al.* (2011) com o isolamento de fungos marinhos de gorgônia, com forte atividade antibacteriana frente aos patógenos *Staphylococcus aureus*, *Micrococcus tetragenus* e *Bacillus subtilis*.

Um dos primeiros estudos, e mais clássicos relatos, utilizando como fonte de moléculas anti-*quorum-sensing* isoladas de organismos marinhos, foi o isolamento de furanonas halogenadas da alga marinha *Delisea pulchra* (KJELLEBERG *et al.*, 1997). Recentemente HUIGENS III *et al.* (2008) realizaram um estudo de rastreamento para bactérias isoladas da esponja *Haliclona simulans* para identificação de moléculas inibidoras do sistema *quorum-sensing* de *P. aeruginosa*, 9 de 30 amostras apresentaram algum tipo de atividade. Em nosso grupo de pesquisa, avaliou-se atividade antibiofilme de bactérias isoladas de organismos marinhos, onde o filtrado de um cultivo fermentativo foi capaz de inibir a formação de biofilme de *S. epidermidis* ATCC 35984 em 88% e de mais 10 amostras de isolados clínicos de *S. epidermidis*, (TRENTIN, 2009). Outro estudo relatando a atividade antibiofilme frente *P. aeruginosa* utilizando extrato da bactéria marinha *Pseudoalteromonas* sp. 3J6, foi realizado por DHEILLY *et al.* (2010).

Os resultados alcançados no rastreamento para atividade antibiofilme revelaram o potencial dos metabólitos de fungos marinhos, tanto na inibição da formação quanto na erradicação de biofilme, porém em diferentes proporções dependendo da bactéria avaliada. Quando considerados os resultados obtidos frente à *S. epidermidis* 5% das amostras apresentaram inibição da formação de biofilme superior a 75%, 1% das amostras apresentaram habilidade de erradicar biofilme acima de 75% e 26% não apresentaram atividade ou estimularam o crescimento de biofilme. Algumas amostras destacaram-se pela presença de alto percentual de inibição da formação de biofilme como o isolado F08 pertencente a classe Dothideomycete (92% de inibição, 14 dias de cultivo) e *Penicillium* sp., isolado F13 (91% de inibição, 14 dias de cultivo e 87% de inibição, 21 dias de cultivo) e o isolado F22 pertencente a ordem Sordariales, destacando-se pela erradicação de biofilme (73% de erradicação de biofilme, 21 dias de cultivo).

Para os ensaios realizados frente *P. aeruginosa*, 5% das amostras apresentaram atividades entre 51 e 75%, tanto de inibição quanto de erradicação de

biofilme pré-formado, e 35% das amostras não apresentaram atividade ou estimularam o crescimento do biofilme. Destacaram-se as amostras de *Penicillium* isolados da esponja *Axinella corrugata* (isolados F37 e F44) e isolado F40 da esponja *Stoeba* sp. com 57% de inibição de biofilme. As amostras de *Simplicillium* sp. (isolado F21), *Phoma* sp. (isolado F25), *Eutypella* sp. (isolado F21) e F22 foram capazes de erradicar biofilme previamente formado acima de 60%.

O número de amostras ativas considerando as bactérias alvo foi maior para *S. epidermidis*. Esta observação foi esperada uma vez que a estrutura celular apresentada pelas bactérias é diferenciada, com presença de uma membrana externa mais delgada nas bactérias gram-negativas, o que também é fator impeditivo na penetração de antibióticos.

Fungos do gênero *Penicillium* apresentaram atividades mais proeminentes e o maior número de espécies isoladas. O potencial antibiofilme de 50 espécies terrestres de *Penicillium* foi verificada por RASMUSSEN *et al.* (2006). Estes pesquisadores identificaram a atividade *quorum-quenching* dos metabólitos patulina e ácido penicílico produzidos por fungos deste gênero. Estes compostos foram responsáveis por um aumento na sensibilidade da *P. aeruginosa* ao antibiótico tobramicina. As espécies do gênero *Phoma* apresentaram as atividades mais proeminentes considerando as amostras cultivadas por um período de 14 dias para a inibição da formação de biofilme de *S. epidermidis* e as amostras cultivadas por 21 dias para a erradicação de biofilme formado por este mesmo patógeno. Metabólito isolado de fungos endofíticos deste gênero (phomodiona, derivado do ácido úsnico), demonstrou atividade antibiótica frente a *S. aureus* com MIC de 1,6 µg/mL (HOFFMAN *et al.*, 2008). Porém, o próprio ácido úsnico foi capaz de inibir a formação de biofilme de *S. aureus* sobre superfícies de poliuretano impregnada com este ácido, além de modificar a estrutura de biofilme de *P. aeruginosa* aderidos nesta superfície, sugerindo a capacidade desta substância de interferir nas rotas sinalizadoras (FRANCOLINI *et al.*, 2004).

O estudo de rastreamento revelou potenciais candidatos para a realização de produção em grande escala para realização do isolamento dos metabólitos ativos. O fungo pertencente a ordem Sordariales (isolado F22, Figura 9A) isolado da esponja *Mycale magniraphidifera* foi selecionado por apresentar importante atividade, em

ensaios de fracionamento bioguiado, como inibidor da formação de biofilme de *S. epidermidis* sem apresentar atividade antibiótica, característica importante quando se deseja investigar substâncias que venham atuar como agentes antibiofilme. De modo semelhante foi selecionado o fungo F37 (Figura 9B), uma espécie de *Penicillium*, associada a esponja *Axinella corrugata*.



**Figura 9.** Fungos associados às esponjas *Mycale magnirhaphidfera* (A, isolado F22) e *Axinella corrugata* (B, isolado F37).

A partir do cultivo em grande escala do fungo pertencente a ordem Sordariales, micélio e caldo foram separados. Após extrações do caldo com acetato de etila, foram realizadas cromatografia em camada delgada de modo preparativo com o extrato bruto, obtendo-se 9 frações semi-purificadas. Ensaios realizados para verificação da inibição da formação de biofilme de *S. epidermidis* revelaram atividade para uma das frações, sem apresentar atividade antibiótica. Utilizando métodos espectroscópicos, espectrométricos e dados encontrados na literatura, foi identificada a substância mevalonolactona (MVL). O isolamento de MVL de fungos de ambiente marinho e terrestre já foi relatado (AMAGATA *et al.*, 1998; PITTAYAKHAJONWUT *et al.* 2002; DING *et al.*, 2008). Diversos estudos têm sido realizados com esta substância deuterada, como marcador para verificação de rotas biossintéticas e metabólicas como, por exemplo, estudos da biossíntese de terpenóides (HOYANO *et al.*, 1980; BERGAMO *et al.*, 2005; EGUSHI, 2006; DICKSHAT *et al.*, 2011); estudos de modulação de HMG-CoA redutase (BEG *et al.* 1984) entre outros. Mevalonolactona, associada a metil-hidantoína, ácido benzóico e ácido láctico, demonstrou atividade antibacteriana frente a bactéria gram-negativa *Enterobacter agglomerans* (NIKU-PAAVLOVA *et al.* 1999), porém não existem relatos para atividade antibiofilme para a MVL.

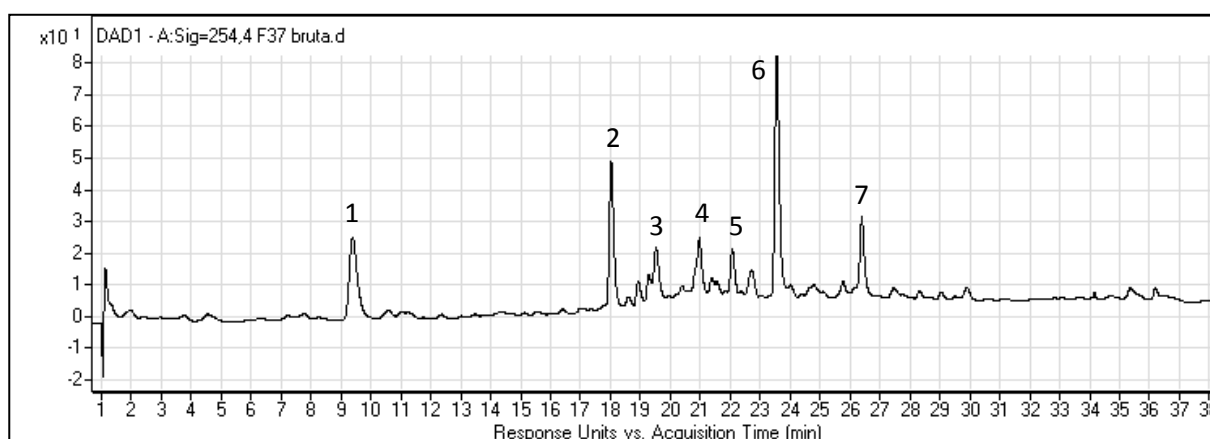
Mevalonolactona é a forma cíclica do ácido mevalônico, ambos fazem parte da rota biossintética de isoprenóides de eucariotos e procariotos, precursora de substâncias como o colesterol. Em bactérias, a regulação desta rota biossintética é pouco conhecida (BALIBAR *et al.* 2009). Análise por RMN permitiu verificar a presença das duas formas quando em solução. Em nosso estudo sugere-se que nas condições experimentais do ensaio antibiofilme (meio aquoso) também ocorra desbalanço no equilíbrio da mevalonolactona com ácido mevalônico, favorecendo a formação deste último. Recentemente, os genes envolvidos na rota biossintética do mevalonato foi investigada para avaliar sua relação com a viabilidade de *Staphylococcus aureus* (BALIBAR *et al.*, 2009). A diminuição da expressão dos genes *mvaS* (regulador da HMG-CoA sintase), *mvaA* (regulador da HMG-CoA redutase), e *mvaK1/D/K2* (regulador da mevalonate kinase) afetou o crescimento bacteriano levando a *downregulation* de genes do metabolismo primário e *upregulation* de fatores de virulência, entre outros (BALIBAR *et al.*, 2009; FERRAND *et al.*, 2011). Como observado em um primeiro momento, nos ensaios realizados frente a *S. epidermidis* ATCC 35984, a MVL não afetou o crescimento bacteriano e somente a inibição da formação do biofilme, o que vem de contra estes dados relatados para *S. aureus*.

Para realização de posteriores experimentos, foi adquirido MVL comercial, devido a pequena quantidade de substância isolada. Com isso, realizou-se o acompanhamento da formação de biofilme *in vitro* durante 48 horas. Os resultados alcançados demonstraram uma formação de biofilme adequada nas condições empregadas após 18 horas de iniciado o experimento, ou seja, existiu a forte adesão das bactérias com presença de agregados celulares e visualização de considerável quantidade de matriz exopolissacarídica. A inibição da adesão das bactérias promovida pela MVL foi observada logo após 6 horas de tratamento, apresentando, após 24 horas do início do experimento, muito poucos agregados sem a presença de matriz exopolissacarídica. Após 48 horas, houve retomada da multiplicação celular pelas bactérias. Este comportamento demonstra que para um sucesso completo da atividade de remoção do biofilme seria adequada a inserção concomitante de antibióticos que auxiliariam no processo provocando a morte celular.

Neste trabalho também foi avaliado o potencial da MVL frente a 12 isolados clínicos de *S. epidermidis* obtidos de catéteres, com diferentes perfis de resistência. Tal estudo se faz importante na busca de um possível candidato para terapia antibiofilme para verificar a abrangência da atividade dentro de uma mesma espécie. Foram utilizadas as concentrações de 2,0 e 0,06 mg/mL de MVL e obtidos resultados de inibição da formação de biofilme e atividade antibacteriana para algumas cepas. Neste caso, a solução com baixa concentração de MVL apresentou maior número de resultados do que aqueles obtidos para as altas concentrações, oposto do que foi obtido com a cepa ATCC. Isto confirmou o polimorfismo genético existente entre os isolados clínicos com diferentes susceptibilidades a agentes antimicrobianos.

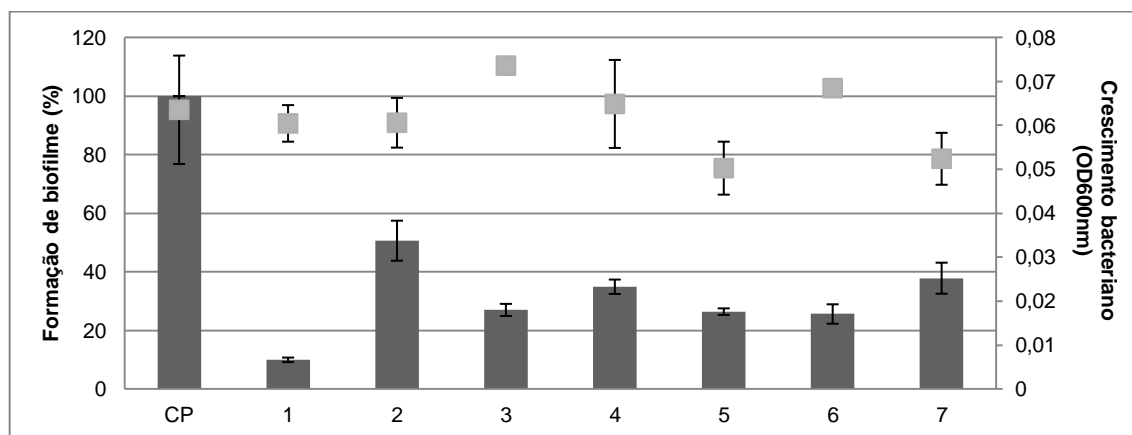
Assim verificamos que a MVL é um composto interessante com capacidade antivirulência e, para alguns isolados clínicos, atividade antibacteriana.

Avaliação do potencial antibiofilme e antibacteriano frente a *S. epidermidis* dos metabólitos isolados do fungo *Penicillium*, associado a esponja *Axinella corrugata*, também apresentou resultados positivos. Após processo fermentativo em grande escala, micélio e caldo foram separados e o caldo foi particionado com acetato de etila. O extrato orgânico foi submetido a cromatografia líquida de alta eficiência de modo semi-preparativo e foram obtidas 7 frações purificadas. O perfil cromatográfico obtido para a realização do fracionamento está apresentado na Figura 10.



**Figura 10.** Perfil cromatográfico do extrato bruto orgânico do filtrado fungo *Penicillium* sp. indicando os 7 metabólitos principais.

As atividades de inibição de formação de biofilme frente *S. epidermidis* e antibacteriana foram verificadas para todas as frações purificadas e os resultados estão apresentados na Figura 11.



**Figura 11.** Avaliação das atividades antibiofilme e antibacteriana das frações isoladas do extrato orgânico do isolado F37 frente a *S. epidermidis*. As colunas representam o percentual de biofilme formado e os quadrados representam a atividade antibacteriana.

Diante destes resultados, com a observação de uma atividade proeminente da fração 1, esta foi identificada utilizando técnicas espectroscópicas, espectrométricas e dados da literatura. Foi identificado o dipeptídeo *cis-cyclo*(leucyl-tyrosyl), inédito para *Penicillium* de origem marinha. A atividade inibidora de biofilme foi observada com 1,0 mg/mL e realizando a visualização por MEV, foi evidenciada a presença de poucas células agregadas, sem a presença de matriz exopolissacarídica, sendo atribuída a molécula uma provável atividade antivirulência. Neste momento, as demais frações purificadas estão sendo elucidadas.

2,5-dicetopiperazinas são dipeptídeos cíclicos encontrados na natureza, comumente biossintetizados a partir de aminoácidos por diferentes organismos, e representa uma promissora classe de produtos naturais biologicamente ativos. As atividades biológicas relacionadas com as 2,5-dicetopiperazinas compreendem as atividades antitumoral, antiviral, antifúngica, antibacteriana, antihiperlipidêmica, antagonista da ocitocina, entre outras (SONG *et al.*, 2003; BRAUNS *et al.*, 2004; RHEE, 2004; MARTINS e CARVALHO, 2007; XIAO e PEI, 2007; BORTHWICK *et al.*, 2012).



Dentro do contexto de inibição de formação de biofilmes, dipeptídeos cíclicos são relatados como moléculas sinalizadoras de bactérias gram-negativas. Existem trabalhos que indicam que *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus mirabilis*, *Citrobacter freundii* e *Enterobacter agglomerans* produzem dicetopiperazinas que se difundem, para o meio extracelular, ativando o sistema *quorum-sensing* (DEGRASSI *et al.*, 2002; RYAN e DOW, 2008). Recentemente, Li *et al.* (2011) identificaram a produção de *cyclo(L-Phe-L-Pro)* e *cyclo(L-Tyr-L-Pro)* por *Lactobacillus reuteri* RC-14 (isolado vaginal) capaz de reprimir a expressão do fator de virulência TSST-1 de *S. aureus* MN8 (protótipo da Síndrome do Choque Tóxico menstrual / TSS) por interferir no sistema *quorum-sensig agr* desta bactéria gram-positiva. Isto pode sugerir um possível mecanismo de ação para este dipeptídeo isolado.

Escassos estudos são encontrados para o dipeptídeo isolado. Somente estudos de identificação molecular como KOPPLE e MARR (1967), SUGUNA e RAMAKUMAR (1984), HUANG *et al* (2007) e HAFIZUR (2008), porém nenhum deles partindo o isolamento de fungos marinho. Dentro desta classe de substâncias existem relatos de isolamento de outros dipeptídeos cíclicos a partir de fungos de origem marinha como *cyclo(L-Phe-L-Pro)*, *cyclo(L-Pro-L-Tyr)*, *cyclo(L-Pro-L-Val)*, e bailainas A-C isolados de *Penicillium bailaii*, (CAPON *et al.*, 2007); cinco novos alcalóides dicetopiperazínicos, brevicompaninas D-H, alobrevicompanina B e fructigenina B foram isolados de *Penicillium* sp. associado a sedimentos e dois destes compostos foram capazes de inibir a produção de lipopolissacarídeo-óxido nítrico induzido em células da microglia (DU *et al.*, 2009); varicolorinas M-O, juntamente com oito análogos foram isolados de *Penicillium griseofulvum* (ZHOU *et al.*, 2010). Além destes, ainda são relatados isolamento de dicetopiperazinas em *Penicillium* de origem terrestre.

O estudo de rastreamento dos metabólitos produzidos pelos fungos marinhos frente ao parasito *T. vaginalis* foi estimulado pela ausência de relatos neste campo. Além disso, o fato de que os microrganismos marinhos participam da defesa química do hospedeiro contra outros microrganismos, entre os quais pode ocorrer a presença de protozoários, também deve ser considerado na expectativa de encontrar metabólitos de fungos com atividade antiprotozoária. Os ensaios foram realizados com as amostras do filtrado, obtidas após a separação do micélio.

O conjunto de resultados obtidos com este experimento permitiu a verificação da atividade anti-*T. vaginalis* (ATCC e isolados clínicos frescos) dos metabólitos de dois fungos marinhos, *Hypocrea lixii* isolado da esponja *Mycale magnirhaphidifera* e *Penicillium citrinum* isolado da esponja *Stoeba* sp. Ressalta-se o aumento do número de trofozoítos pela grande maioria dos filtrados. Sugere-se que este aumento esteja relacionado com a presença de glicose (20%) nos filtrados. Pesquisadores relatam que a rota enzimática dos tricomonas é estimulada na presença de glicose (KUILE, 1996).

Estes fungos também foram avaliados quanto a citotoxicidade através da construção de uma curva cinética de crescimento, e foram capazes de diminuir a densidade de trofozoítos em 24 horas. A capacidade dos metabólitos presentes nos filtrados causarem dano em membrana celular pelo ensaio de hemólise foi verificada, e estes não apresentaram efeito hemolítico, sugerindo baixa toxicidade ao hospedeiro.

O baixo percentual de amostras ativas (1,6%) também foi verificado no rastreamento realizado com 23 plantas da Caatinga, onde somente 4% dos extratos foram ativos (FRASSON *et al.*, 2011) porém, com uma MIC sensivelmente inferior (1,56 mg/mL). Os valores de MIC apresentados não são considerados elevados, uma vez que se tratam de amostras brutas. O esperado é que, uma vez purificadas, os compostos isolados apresentem MIC inferiores ao valor encontrado. Considerando a atividade hemolítica frente a eritrócitos e produtos naturais, os filtrados de fungos marinhos apresentaram vantagens frente a frações enriquecidas de saponinas de espécies de *Quillaja*, *Passiflora* e *Ilex*. Estas frações foram capazes de lisar os eritrócitos (ROCHA *et al.*, 2012).

Tanto *P. citrinum* quanto *H. lixii* são reportados em estudos onde são investigadas atividades biológicas importantes como citotoxicidade frente células HL-60 (leucemia promielocítica) e atividade antimicrobiana (NI *et al.* 2011; ZHANG *et al.* 2011), respectivamente. Além disso, também é relatada a atividade para os metabólitos JBIR-59 e JBIR-124, isolados do fungo *Penicillium citrinum*, associado a esponja, apresentando atividade antioxidante (UEDA *et al.*, 2010; KAWAHARA *et al.*, 2012)

A importância deste estudo está fundamentada no fato de que as opções de tratamento da tricomonose são escassas e a sua gravidade não é menos importante que as outras doenças parasitárias. O número de casos de *T. vaginalis* resistentes ao metronidazol, uma das opções de tratamento, atingiu 9% e a ausência de alternativas faz com que sejam aumentadas as doses deste medicamento, agravando o aparecimento de efeitos adversos (SCHWEBKE e BARRIENTES, 2006).

Como conclusão, a investigação de compostos bioativos utilizando método de rastreamento como ponto inicial de partida representou uma ferramenta útil para obter-se um panorama geral das propriedades antibiótica, antibiofilme e anti-*T. vaginalis* dos metabólitos presentes nos filtrados dos fungos associados a organismos marinhos da costa Sul brasileira. O conjunto de resultados obtidos neste trabalho abre perspectivas para a continuidade da pesquisa de metabólitos bioativos, uma vez que a resistência aos antibióticos continua a crescer em hospitais e na comunidade, envolvendo patógenos gram-positivos e gram-negativos, bem como parasitos.





Os experimentos apresentados nesta Tese revelam a atividade dos fungos associados a organismos marinhos presentes na costa Sul brasileira frente a microrganismos patogênicos. Assim podemos concluir que:

1. Os organismos marinhos (esponjas, algas e ascídia) presentes no litoral Catarinense, especificamente na Ilha do Arvoredo, apresentaram grande diversidade de fungos associados.
2. Entre os 15 diferentes gêneros isolados, os mais abundantes foram *Penicillium* e *Cladosporium* e entre as espécies identificadas 7 destas não foram descritas anteriormente para ambiente marinho.
3. Os fungos isolados neste trabalho, em sua grande maioria, apresentaram atividades antibiótica, inibição da formação de biofilme e erradicação de biofilme contra as bactérias *S. epidermidis* e *P. aeruginosa*.
4. O cultivo em grande escala do fungo pertencente a ordem Sordariales, isolado da esponja *Mycale magnirhaphidifera*, permitiu realizar o isolamento de mevalonolactona com atividades inibidora da formação de biofilme de *S. epidermidis* ATCC e antibiótica para isolados clínicos.
5. A partir de uma espécie de *Penicillium*, isolada da esponja *Axinella corrugata*, foi possível a obtenção do dipeptídeo *cis-cyclo(leucyl-tyrosyl)* com atividade inibidora da formação de biofilme de *S. epidermidis*, cepa ATCC.
6. Isolados das esponjas *Axinella corrugata* e *Stoeba* sp., os fungos *Hypocrea lixii* e *Penicillium citrinum*, respectivamente, apresentaram atividade tricomonocida, frente cepas ATCC e isolados clínicos, com ausência de efeito hemolítico.

O conjunto dos resultados obtidos evidencia o potencial de fungos associados a organismos marinhos para a obtenção de produtos bioativos e corrobora com trabalhos anteriores, indicando ser esta área de grande relevância para a busca de novos fármacos.









Levando em consideração o volume de resultados obtidos com a realização do rastreamento para as atividades antibiótica, antibiofilme e anti-*T. vaginalis* e a identificação de dois compostos isolados com atividades ainda não reportadas para biofilmes de *S. epidermidis*, as perspectivas em curto prazo deste trabalho são:

1. Investigar os mecanismos envolvidos na inibição da formação do biofilme de *S. epidermidis* pelo composto mevalonolactona, avaliando se o processo de inibição não se trata da formação de uma barreira física;
2. Investigar os mecanismos envolvidos na inibição da formação de biofilme de *S. epidermidis* pelo isolado *cis-cyclo*(leucyl-tyrosyl);
3. Avaliar o potencial do dipeptídeo frente a isolados clínicos de *S. epidermidis*;
4. Identificar os seis metabólitos isolados do fungo *Penicillium* sp. uma vez que todos apresentaram consideráveis atividades inibidoras da formação de biofilme de *S. epidermidis*;
5. Realizar o processo de fermentação em grande escala para os fungos que apresentaram atividade anti-*T. vaginalis* com a finalidade de isolamento e identificação dos metabólitos ativos.







ABDEL-LATEFF, A. A.-A. M. *Secondary metabolites of marine-derived fungi: natural product chemistry and biological activity*. Dissertação. Bonn: Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität. 2004. 123 p.

ADAGU, S. I.; NOLDER, D.; WARHURST, D. C.; ROSSIGNOL, J-F. *In vitro* activity of nitazoxanide and related compounds against isolates of *Giardia intestinalis*, *Entamoeba histolytica* and *Trichomonas vaginalis*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 49, p. 103-111, 2002.

AICHER, T. D.; BUSZEK, K. R.; FANG, F. G.; FORSYTH, C. J.; JUNG, S. H.; KISHI, Y.; MATELICH, M. C.; SCOLA, P. M.; SPERO, D. M.; YOON, S. K. Total synthesis of Halichondrin B and Norhalichondrin. *Journal of American Chemical Society*, v. 114, p. 3162-3164, 1992.

ALEKSHUN, M. N.; LEVY, S. B. Targeting virulence to prevent infection: to kill or not to kill?. *Drug Discovery Today: Therapeutic Strategies*, v. 1, 483-489, 2004.

AMAGATA, T.; USAMI, Y.; MINOURA, K.; ITO, T.; NUMATA, A. Cytotoxic substances produced by a fungal strain from a sponge: physico-chemical properties and structures. *The Journal of Antibiotics*, v. 51, n. 1, p. 33-40, 1998.

AZEVEDO, L. G.; MUCCILLO-BAISCH, A. L.; FILGUEIRA, D. DE M.V.B.; BOYLE, R. T.; RAMOS, D. F.; SOARES, A. D.; LERNER, C.; SILVA, P. A.; TRINDADE, G. S. Comparative cytotoxic and anti-tuberculosis activity of *Aplysina caissara* marine sponge crude extracts. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C*, v. 147, p. 36-42, 2008a.

AZEVEDO, L. G.; PERAZA, G. G.; LERNER, C.; SOARES, A.; MURCIA, N.; MUCCILLO-BAISCH, A. L. Investigation of the anti-inflammatory and analgesic effects from an extract of *Aplysina caissara*, a marine sponge. *Fundamental and Clinical Pharmacology*, v. 22, n. 5, p. 549-556, 2008b.

BAKER, D. D.; CHU, M.; OZA, U.; RAJGARHIA, V. The value of natural products to future pharmaceutical discovery. *Natural Product Reports*, v. 24, p. 1225–1244, 2007.

BALIBAR, C. J.; SHEN, X.; TAO, J. The mevalonate pathway of *Staphylococcus aureus*. *Journal of Bacteriology*, v. 191, p. 851-861, 2009.

BARCZAK, A. K.; HUNG, D. T. Productive steps toward an antimicrobial targeting virulence. *Current Opinion in Microbiology*, v. 12, p. 1–7, 2009.

BAVEJA, J. K.; WILLCOX, M. D. P.; HUME, E. B. H.; KUMAR, N.; ODELL, R.; POOLE-WARREN, L. A. Furanones as potential anti-bacterial coatings on biomaterials. *Biomaterials*, v. 25, p. 5003–5012, 2004.

BEG, Z. H.; STONIK, J. A.; BREWER JR, H. B. *In vivo* modulation of rat liver 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase, reductase kinase, and reductase kinase kinase by mevalonolactone. *PNAS*, v. 81, p. 7293-7297, 1984.

BELARBI, E. H.; GOMEZ, A. C.; CHISTI, Y. Producing drugs from marine sponges. *Biotechnology Advances*, v. 21, p. 585–598, 2003.

BELLEMAIN, E.; CARLSEN, T.; BROCHMANN, C.; COISSAC, E.; TABERLET, P.; KAUSERUD, H. ITS as an environmental DNA barcode for fungi: an *in silico* approach reveals potential PCR biases. *BMC Microbiology*, v. 10, p. 189-198, 2010.

BENTLEY, R.; BENNETT, J. W. Biosynthesis of secondary metabolites. In: BERRY, D. R. *Physiology of industrial fungi*. Blackwell scientific publications, 1988. p 161 – 183.

BERGAMO, D. C. B. I.; KATO, M. J.; BOLZANI, V. S.; FURLAN, M. Biosynthetic origins of the isoprene units of 4-nerolidylcatechol in *Potomorphe umbellata*. *Journal of Brazilian Chemistry Society*, v.16, n. 6b, p. 1406-1409, 2005.

BERGMANN, W.; FEENEY, R. J. Contributions to the study of marine products. XXXII. The nucleosides of sponges. I. *Journal of Organic Chemistry*, v. 16, p. 981-987, 1951.

BERLINCK, R. G. S.; HAJDU, E.; ROCHA, R. M. da; OLIVEIRA, J. H. H. L. de; HERNÁNDEZ, I. L. C.; SELEGHIM, M. H. R.; GRANATO, A. C.; ALMEIDA, E. V. R. de; NUÑEZ, C. V.; MURICY, G.; PEIXINHO, S.; PESSOA, C.; MORAES, M. O.; CAVALCANTI, B. C.; NASCIMENTO, G. G. F.; THIEMANN, O.; SILVA, M.; SOUZA, A. O.; SILVA, C. L.; MINARINI, P. R. R. Challenges and rewards of research in marine natural products chemistry in Brazil. *Journal of Natural Products*, v. 67, p. 510-522, 2004.

BHADURY, P.; MOHAMMAD, B. T.; WRIGHT, P. C. The current status of natural products from marine fungi and their potential as anti-infective agents. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. v. 33, p. 325–337, 2006.

BIABANI, M. A. F.; LAATSCH, H. Advances in chemical studies on low-molecular weight metabolites of marine fungi. *Journal für Praktische Chemie. Chemie Zeitung*, v. 340, p. 589-607, 1998.

BLUNT, J. W.; COPP, B. R.; MUNRO, M. H. G.; NORTHCOTE, P. T.; PRINSEP, M.R. Marine natural products. *Natural Product Reports*, v. 20, p. 1–48, 2003.

BLUNT, J. W.; COPP, B. R.; MUNRO, M. H. G.; NORTHCOTE, P. T.; PRINSEP, M.R. Marine natural products. *Natural Product Reports*, v. 21, p. 1–49, 2004.



BLUNT, J. W.; COPP, B. R.; MUNRO, M. H. G.; NORTHCOTE, P. T.; PRINSEP, M.R. Marine natural products. *Natural Product Reports*, v. 22, p. 15–61, 2005.

BLUNT, J. W.; COPP, B. R.; MUNRO, M. H. G.; NORTHCOTE, P. T.; PRINSEP, M.R. Marine natural products. *Natural Product Reports*, v. 23, p. 26–78, 2006.

BLUNT, J. W.; COPP, B. R.; HU, W-P; MUNRO, M. H. G.; NORTHCOTE, P. T.; PRINSEP, M.R. Marine natural products. *Natural Product Reports*, v. 24, p. 26–78, 2007.

BLUNT, J. W.; COPP, B. R.; HU, W-P; MUNRO, M. H. G.; NORTHCOTE, P. T.; PRINSEP, M.R. Marine natural products. *Natural Product Reports*, v. 25, p. 35–94, 2008.

BLUNT, J. W.; COPP, B. R.; HU, W-P; MUNRO, M. H. G.; NORTHCOTE, P. T.; PRINSEP, M.R. Marine natural products. *Natural Product Reports*, v. 26, p. 170–244, 2009.

BLUNT, J. W.; COPP, B. R.; HU, W-P; MUNRO, M. H. G.; NORTHCOTE, P. T.; PRINSEP, M.R. Marine natural products. *Natural Product Reports*, v. 27, p. 165–237, 2010.

BLUNT, J. W.; COPP, B. R.; KEYZERS, R. A.; MUNRO, M. H. G.; PRINSEP, M. R. Marine natural products. *Natural Product Reports*, v. 28, 196-275, 2011.

BLUNT, J. W.; COPP, B. R.; KEYZERS, R. A.; MUNRO, M. H. G.; PRINSEP, M. R. Marine natural products. *Natural Product Reports*, v. 29, p. 144- 222, 2012.

BOLES, B. R.; HORSWILL, A. R. *agr*-mediated dispersal of *Staphylococcus aureus* biofilms. *PLoS Pathogens*, v. 4, p.e1000052, 2008.

BORTHWICK, A. D.; LIDDLE, J.; DAVIES, D. E.; EXALL, A. M.; HAMLETT, C.; HICKEY, D. M.; MASON, A. M.; SMITH, I. E. D.; NEROZZI, F.; PEACE, S.; POLLARD, D.; SOLLIS, S. L.; ALLEN, M. J.; WOOLLARD, P. M.; PULLEN, M. A.; WESTFALL, T. D.; STANISLAUS, D. J. Pyridyl-2,5-diketopiperazines as potent, selective, and orally bioavailable oxytocin antagonists: synthesis, pharmacokinetics, and *in vivo* potency. *Journal of Medicinal Chemistry*, DOI: 10.1021/jm201287w, 2012.

BRAUNS, S. C.; MILNE, P.; NAUDÉ, R.; DE VENTER, M. V. Selected cyclic dipeptides inhibit cancer cell growth and induce apoptosis in HT-29 colon cancer cells. *Anticancer Research*, v. 24, n. 3a, p. 1713-1719, 2004.

BRUSCA, R. C., BRUSCA, G. J. Filo Porífera: As Esponjas. In: BRUSCA, R. C., BRUSCA, G. J. Invertebrados, 2 ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2007. p. 185–216.

BUGNI, T. S.; IRELAND, C. M. Marine-derived fungi: a chemically and biologically diverse group of microorganisms. *Natural Product Reports*, v. 21, p. 143–163, 2004.

BUTLER, M. S. The Role of Natural Product Chemistry in Drug Discovery. *Journal of Natural Products*, v. 67, n. 12, p. 2141-2153, 2004.

CAPON, R. J.; STEWART, M.; RATNAYAKE, R.; LACEY, E.; GILL, J. H. Citromycetins and Bilains A–C: New aromatic polyketides and diketopiperazines from australian marine-derived and terrestrial *Penicillium* spp. *Journal of Natural Products*, v. 70, n. 11, p. 1746-1752, 2007.

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.

CHANDRA, J.; PATEL, J. D.; LI, J.; ZHOU, G; MUKHERJEE, P. K.; MCCORMICK, T. S.; ANDERSON, J. M.; GHANNOUM, M. A. Modification of surface properties of biomaterials influences the ability of *Candida albicans* to form biofilms. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 71, n. 12, p. 8795–8801, 2005.

CHERPES, T. L.; WIESENFELD, H. C.; MELAN, M. A.; KANT, J. A.; COSENTINO, L. A.; MEYN, L. A.; HILLIER, S. L. The associations between pelvic inflammatory disease, *Trichomonas vaginalis* infection, and positive *Herpes simplex virus* type 2 serology. *Sexually Transmitted Diseases*, v. 33, p. 747-752, 2006.

CHRISTOPHERSEN, C.; CRESCENTE, O.; FRISVAD, J. C.; GRAM, L.; NIELSEN, J.; NIELSEN, P. H.; RAHBÆK, L. Antibacterial activity of marine-derived fungi. *Mycopathologia*, v. 143, p. 135–138, 1998.

CLARKE, M. B.; HUGHES, D. T.; ZHU, C.; BOEDEKER, E. C.; SPERANDIO, V. The QseC sensor kinase: A bacterial adrenergic receptor. *PNAS*, v. 103, p. 10420 - 10425, 2006.

CLATWORTHY, A. E.; PIERSON, E.; HUNG, D. T. Targeting virulence: a new paradigm for antimicrobial therapy. *Nature Chemical Biology*, v. 3, n. 9, p. 541-547, 2007.

COSTA-LOTUFO, L. V.; WILKE, D. V.; JIMENEZ, P. C.; EPIFANIO, R. DE A. Organismos marinhos como fonte de novos fármacos: Histórico e Perspectivas. *Química Nova*, v. 32, n. 3, p. 703-716, 2009.

COSTERTON, J. W. Introduction to biofilm. *International Journal of Antimicrobial Agents*, v. 11, p. 217–221, 1999.

COSTERTON, J. W.; STEWART, P. S.; GREENBERG, E. P. Bacterial Biofilms: A Common Cause of Persistent Infections. *Science*, v. 284, n. 5418, p. 1318-1322, 1999.

COTCH, M. F.; PASTOREK, J. G.; NUGENT, R. P.; YERG, D. E.; MARTIN, D. H.; ESCHENBACH, D. A. Demographic and behavioral predictors of *Trichomonas vaginalis* infection among pregnant women. The vaginal infections and prematurity study group. *Obstetrics and Gynecology*, v. 78, p. 1087-1092, 1991.

COTCH, M. F.; PASTOREK, J. G.; NUGENT, R. P.; HILLIER, S. L.; GIBBS, R. S.; MARTIN, D. H.; ESCHENBACH, D. A.; EDELMAN, R.; CAREY, J. C.; REGAN, J. A.; KROHN, M. A.; , KLEBANOFF, M. A.; RAO, A. V.; RHOADS, G. G. *Trichomonas vaginalis* associated with low birth weight and preterm delivery. The vaginal infections and prematurity study group. *Sexually Transmitted Diseases*, v. 24, p. 353-60, 1997.

CUDMORE, S. L.; DELGATY, K. L.; HAYWARD-MCCLELLAND, S. F.; PETRIN, D. P.; GARBER, G. E. Treatment of infections caused by metronidazole-resistant *Trichomonas vaginalis*. *Clinical Microbiology Reviews*, v. 17, n. 4, p. 783-793, 2004.

CUOMO, V.; PALOMBA, I.; PERRETTI, A.; GUERRIERO, A.; D'AMBROSIO, M.; PIETRA, F. Antimicrobial activities from marine fungi. *Journal of Marine Biotechnology*, v. 2, n. 4, p. 199-204, 1995.

DA FROTA JR, M. L. C.; BRAGANHOL, E.; CANEDO, A. D.; KLAMT, F.; APEL, M. A. MOTHE, B.; LERNER, C.; BATTASTINI, A. M. O.; HENRIQUES, A. T.; MOREIRA, J. C. F. Brazilian marine sponge *Polymastia janeirensis* induces apoptotic cell death in human U138MG glioma cell line, but not in a normal cell culture. *Investigational New Drugs*, v. 27, n.1, p. 13–20, 2009a.

DA FROTA JR, M. L. C.; BRAGANHOL, E.; CANEDO, A. D.; KLAMT, F.; APEL, M. A. MOTHE, B.; LERNER, C.; BATTASTINI, A. M. O.; HENRIQUES, A. T.; MOREIRA, J. C. F. Extracts of marine sponge *Polymastia janeirensis* induce oxidative cell death through a caspase-9 apoptotic pathway in human U138MG glioma cell line. *Investigational New Drugs*, v. 27, n. 5, p. 440-6, 2009b.

DAMARE, S. R. *Deep-Sea Fungi: Occurrence and Adaptations*. Tese. Índia: Goa University, 2006.

DAVIES, D. Understanding biofilm resistance to antibacterial agents. *Nature Reviews: Drug Discovery*, v. 2, p. 114-122, 2003.

DEGRASSI, G.; AGUILAR, C.; BOSCO, M.; ZAHARIEV, S.; PONGOR, S.; VENTURI, V. Plant growth-promoting *Pseudomonas putida* WCS358 produces and secretes four cyclic dipeptides: cross-talk with quorum sensing bacterial sensors. *Current Microbiology*, v. 45, n. 4, p. 250-254, 2002.

DICKSCHAT, J. S.; CITRON, C. A.; BROCK, N. L.; RICLEA, R.; KUHZ, H. Synthesis of deuterated mevalonolactone isotopomers. *European Journal of Organic Chemistry*, n. 18, p. 3339-3346, 2011.

DIMASSA, J. A.; HANSEN, R. W.; GRABOWSKI, H. G. The price of innovation: new estimates of drug development costs. *Journal of Health Economics*, v. 22, p. 151-85, 2003.

DHEILLY, A.; SOUM-SOUTÉRA, E.; KLEIN, G. L.; BAZIRE, A.; COMPÈRE, C.; HARAS, D.; DUFOUR, A. Antibiofilm activity produced by the marine bacterium *Pseudoalteromonas* sp. 3J6. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 76, p. 3452-3461, 2010.

DIGGLE, S. P.; GRIFFIN, A. S.; CAMPBELL, G. S.; WEST, S. A. Cooperation and conflict in quorum-sensing bacterial populations. *Nature Letters*, v. 450, p. 411-415, 2007.

DING, L.; QIN, S.; LI, F.; CHI X.; LAATSCH, H. Isolation, antimicrobial activity, and metabolites of fungus *Cladosporium* sp. associated with red alga *Porphyra yezoensis*. *Current Microbiology*, v. 56, p. 229-235, 2008.

DONG, Y.-H.; WANG, L.-H; ZHANG, L.-H. Quorum-quenching microbial infections: mechanisms and implications. *Philosophical Transactions. The Royal Society B*, v. 362, p. 1201–1211, 2007.

DRESCH, R. R.; HAESER, A. S.; LERNER, C.; MOTHEs, B.; VOZÁRI-HAMPE, M. M.; HENRIQUES, A. T. Detecção de atividade lectínica e atividade hemolítica em extratos de esponjas (Porifera) nativas da costa atlântica do Brasil. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 15, n. 1, p. 16-22, 2005.

DRESCH, R. R. *Purificação e caracterização das lectinas ACL-I e ACL-II da esponja marinha Axinella corrugata, imunolocalização da ACL-I e avaliação do seu potencial como marcador de transformação celular*. Tese. Porto Alegre: UFRGS, 2008. 222p.

DRESCH, R.; ZANETTI, G.; LERNER, C.; MOTHEs, B.; TRINDADE, V.; HENRIQUES, A. T.; VOZARIHAMPE, M. M. ACL-I, a lectin from the marine sponge *Axinella corrugata*: Isolation, characterization and chemotactic activity. *Comparative Biochemistry and Physiology. C, Toxicology & Pharmacology*, v. 148, p. 23-30, 2008.

DRESCH, R.; ZANETTI, G. D.; KANAN, J. H. C.; MOTHEs, B.; LERNER, C.; MOTHEs, B.; TRINDADE, V. M. T.; HENRIQUES, A. T.; VOZARI-HAMPE, M. M. Immunohistochemical localization of an N-acetyl amino-carbohydrate specific lectin (ACL-I) of the marine sponge *Axinella corrugata*. *Acta Histochemica*, v. 113, p. 671-674, 2011.

DRESCH, R.; LERNER, C.; MOTHE, B.; TRINDADE, V. M. T.; HENRIQUES, A. T.; VOZÁRI-HAMPE, M. M. Biological activities of ACL-I and physicochemical properties of ACL-II, lectins isolated from the marine sponge *Axinella corrugata*. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 2012. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cbpb.2012.01.001>.

DU, L.; YANG, X.; ZHU, T.; WANG, F.; XIAO, X.; PARK, H.; GU, Q. Diketopiperazine alkaloids from a deep ocean sediment derived fungus *Penicillium* sp. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, v. 57, n. 8, p. 873-876, 2009.

DUNNE, R. L.; DUNN, L. A.; UPCROFT, P.; O'DONOGHUE, P. J.; UPCROFT, J. A. Drug resistance in the sexually transmitted protozoan *Trichomonas vaginalis*. *Cell Research*, v. 13, n. 4, p. 239-249, 2003.

EFFENDI, H. *Isolation and structure elucidation of bioactive secondary metabolites of sponge-derived fungi collected from the Mediterranean sea (Italy) and Bali sea (Indonesia)*. Dissertação. Düsseldorf: Heinrich-Heine Universität, 2004. 223p.

EGUSHI, T. Mevalonolactone-d(9); A versatile tool for biosynthetic study of isoprenoids. Synthesis and its application. *Journal of Synthetic Organic Chemistry*, v. 63, n. 11, p. 1069-1079, 2005.

ERIBULIN. FDA Approval for Eribulin Mesylate, 2010. Acesso em 20 de janeiro de 2012. Disponível em: [www.cancer.gov/cancertopics/druginfo/fda-eribulinmesylate](http://www.cancer.gov/cancertopics/druginfo/fda-eribulinmesylate).

ESCAICH, S. Antivirulence as a new antibacterial approach for chemotherapy *Current Opinion in Chemical Biology*, v. 12, p. 400-408, 2008.

FAUCI, A. S. Infectious Diseases: Considerations for the 21st Century. *Clinical Infectious Diseases*, v. 32, p. 675-85, 2001.

FAULKNER, D. J. Marine natural products. *Natural Product Reports*, v. 17, p. 7-55, 2000.

FAULKNER, D. J. Marine natural products. *Natural Product Reports*, v. 18, p. 1–49, 2001.

FAULKNER, D. J. Marine natural products. *Natural Product Reports*, v. 19, p. 1–48, 2002.

FEDERLE, M. J; BASSLER, B. L. Interspecies communication in bacteria. *The Journal of Clinical Investigation*, v. 112, p. 1291-1299, 2003.

FENICAL, W. New Pharmaceuticals from marine organisms. *Trends in Biotechnology*, v. 15, n. 9, p. 339-341, 1997.

FERRAND, S.; TAO, J.; SHEN, X.; MCGUIRE, D.; SCHMID, A.; GLICKMAN, J. F.; SCHOPFER, U. Screening for mevalonate biosynthetic pathway inhibitors using sensitized bacterial strains. *Journal of Biomolecular Screening*, v. 16, p. 637-646, 2011.

FICHOROVA, R. N. Impact of *T. vaginalis* infection on innate immune responses and reproductive outcome. *Journal of Reproductive Immunology*, v. 83, p. 185-189, 2009.

FRANCOLINI, I.; NORRIS, P.; PIOZZI, A.; DONELLI, G.; STOODLEY, P. Usnic acid, a natural antimicrobial agent able to inhibit bacterial biofilm formation on polymer surfaces. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 48, n. 11, p. 4360-4365, 2004.

FRASSON, A. P.; SANTOS, O.; DUARTE, M.; TRENTIN, D. S.; GIORDANI, R. B.; SILVA, A. G.; SILVA, M. V.; TASCAT, T.; MACEDO, A. J. First report of anti-*Trichomonas vaginalis* activity of the medicinal plant *Polygala decumbens* from the Brazilian semi-arid region, Caatinga. *Parasitology Research*. DOI 10.1007/s00436-011-2787-4, 2011.



GAO, J.; RADWAN, M. M.; LEO´N, F.; WANG, X.; JACOB, M. R.; • TEKWANI, B. L.; KHAN, S. I.; LUPIEN, S.; HILL, R. A.; DUGAN, F. M.; CUTLER, H. G.; CUTLER, S. J. Antimicrobial and antiprotozoal activities of secondary metabolites from the fungus *Eurotium repens*. *Medicinal Chemistry Research*. DOI 10.1007/s00044-011-9798-7, 2011.

GIORDANI, R. B.; ALMEIDA, M. V.; FERNANDES, E.; COSTA, C. F.; De CARLI, G. A.; TASCA, T.; ZUANAZZI, J. A. Anti-*T. vaginalis* activity of synthetic lipophilic diamine and aminoalcohol derivatives. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, v. 63, p. 613-617, 2009.

GIORDANI, R. B.; VIEIRA, P. DE B.; WEIZENMANN, M.; ROSEMBERG, D. B.; SOUZA, A. P.; BONORINO, C.; DE CARLI, G. A.; BOGO, M. R.; ZUANAZZI, J. A.; TASCA, T. Candimine-induced cell death of the amitochondriate parasite *Trichomonas vaginalis*. *Journal of Natural Products*, v. 73, n. 12, p. 2019-2023, 2010.

GIORDANI, R. B.; VIEIRA, P. DE B.; WEIZENMANN, M.; ROSEMBERG, D. B.; SOUZA, A. P.; BONORINO, C.; DE CARLI, G. A.; BOGO, M. R.; ZUANAZZI, J. A.; TASCA, T. Lycorine induces cell death in the amitochondriate parasite, *Trichomonas vaginalis*, via an alternative non-apoptotic death pathway. *Phytochemistry*, v. 72, n. 7, p. 645-650, 2011.

GLOER, J. B. Applications of Fungal Ecology in the Search for New Bioactive Natural Products. In: KUBICEK, C. P.; DRUZHININA, I. S. (eds.). *The Mycota IV. Environmental and Microbial Relationships*. 2 ed. Nova Iorque: Springer-Verlag, 2007. cap. 15, p. 257-286.

GOLDMAN, L.M.; UPCROFT, J.A.; WORKOWSKI, K.; RAPKIN, A. Treatment of metronidazole-resistant *Trichomonas vaginalis*. *Sexual Health*, v. 6, p. 345-347, 2009.

GRODSTEIN, F.; GOLDMAN, M.B.; CRAMER, D.W. Relation of tubal infertility to a story of sexually transmitted diseases. *American Journal of Epidemiology*, v. 137, p. 577-584, 1993.

HAFIZUR, R. Unusual sesquiterpenes: gorgonenes and further bioactive secondary metabolites derived from marine and terrestrial bacteria. Dissertação. Göttingen: Georg-August-Universität, 2008. 208 p.

HELMS, D. J.; MOSURE, D. J.; SECOR, W. E.; WORKOWSKI, K. A. Management of *Trichomonas vaginalis* in women with suspected metronidazole hypersensitivity. *American Journal of Obstetrics & Gynecology*, v. 198, p. 370–377, 2008.

HENTZER, M.; GIVSKOV, M. Pharmacological inhibition of quorum sensing for the treatment of chronic bacterial infections. *Journal of Clinical Investigation*, v. 112, p. 1300–1307, 2003.

HETT, E. C.; HUNG, D. T. Targeting multiple biofilm pathways. *Chemistry and Biology*, v. 16, n. 12, p. 1216-1218, 2009.

HOFFMAN, A. M.; MAYER S, G.; STROBEL, G. A.; HESS W, M.; SOVOCOOL, G. W.; GRANGE, A. H.; HARPER, J. K.; ARIF, A. M.; GRANT, D. M.; KELLEY-SWIFT E, G. Purification, identification and activity of phomodione, a furandione from an endophytic *Phoma* species. *Phytochemistry*, v. 69, p. 1049-1056, 2008.

HØIBY, N.; BJARNSHOLT, T.; GIVSKOV, M.; MOLIN, S.; CIOFU, O. Antibiotic resistance of bacterial biofilms. *International Journal of Antimicrobial Agents*, v. 35, n. 4, p. 322-332, 2010.

HÖLLER, U.; WRIGHT, A. D.; MATTHEE, G. F.; KONIG, G. M.; DRAEGER, S.; AUST, H. J.; SCHULZ, B. Fungi from marine sponges: diversity, biological activity and secondary metabolites. *Mycological Research*, v. 104, p. 1354-1365, 2000.

HOYANO, Y.; STOESSL, A.; STOTHE, J. B. Biosynthesis of the antifungal sesquiterpene capsidiol. Confirmation of a hydride shift by <sup>2</sup>H magnetic resonance. *Canadian Journal of Chemistry*, v. 58, p. 1894-1896, 1980.

HUANG, H.; SHE, Z.; LIN, Y.; VRIJMOED, L. P.; LIN, W. Cyclic peptides from an endophytic fungus obtained from a mangrove leaf (*Kandelia candel*). *Journal of Natural Products*, v. 70, p. 1696-1699, 2007.

HUIGENS III, R. W.; MA, L.; GAMBINO, C.; MOELLER, P. D. R.; 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.

IBAMA. Reserva Biológica Marinha do Arvoredo. Encarte 3- Análise da UC. Brasília, 2004. Acesso em 22 de janeiro de 2012. Disponível em: [http://www.icmbio.gov.br/brasil/SC/reserva-biologica-marinha-do-arvoredo/rebio\\_arvoredo\\_-\\_pm\\_-\\_encarte3.pdf](http://www.icmbio.gov.br/brasil/SC/reserva-biologica-marinha-do-arvoredo/rebio_arvoredo_-_pm_-_encarte3.pdf).

JADULCO, R.; EDRADA, R. A.; EBEL, R.; BERG, A.; SCHAUMANN, K.; WRAY, V.; STEUBE, K.; PROKSCH, P. New communesin derivatives from the fungus *Penicillium* sp. derived from the Mediterranean sponge *Axinella verrucosa*. *Journal of Natural Products*, v. 67, n. 1, p. 78-81, 2004.

JAIN, S.; VAHDAT, L. T. Eribulin Mesylate. *Clinical Cancer Research*, v. 17, n. 21, p. 6615-6622, 2011.

JENSEN, P. R.; FENICAL, W. Secondary metabolites from marine fungi. In: HYDE, K. D. Fungi in marine environments. *Fungal Diversity Research Series*, v. 7, p. 293-315, 2002.

JONES, E. B. G. Marine fungi: some factors influencing biodiversity. *Fungal Diversity*, v. 4, p. 53-73, 2000.

JONES, E. B. G.; SAKAYARO, J. J.; SUETRONG, S.; SOMRITHIPOL, S.; PANG, K.L. Classification of marine Ascomycota, anamorphic taxa and Basidiomycota. *Fungal Diversity*, v. 35, p. 1-187, 2009.

JONES, E. B. Are there more marine fungi to be described? *Botanica Marina*, v. 54, p. 343-354, 2011.

KASSAI, T.; CORDERO DEL CAMPILLO, M.; EUZEBY, J.; GAAFAR, S.; HIEPE, T.; HIMONAS, C. A. Standardized nomenclature of animal parasitic diseases (SNOAPAD). *Veterinary Parasitology*, v. 29, p. 299-326, 1988.

KATSIKOIANNI, M.; MISSIRLIS, Y. F. Concise review of mechanisms of bacterial adhesion to biomaterials and of techniques used in estimating bacteriamaterial interactions. *European Cells and Materials*, v. 8, p. 37-57, 2004.

KAWAHARA, T.; TAKAGI, M.; SHIN-YA, K. JBIR-124: a novel antioxidative agent from a marine sponge-derived fungus *Penicillium citrinum* Spl080624G1f01. *The Journal of Antibiotics*, v. 65, p. 45-47, 2012.

KELECOM, A. Secondary metabolites from marine microorganisms. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, v. 74, p. 151-170, 2002.

KELLER, N. P.; TURNER, G.; BENNETT, J. W. Fungal secondary metabolism – from biochemistry to genomics. *Nature Reviews: Microbiology*, v. 3, p. 937-947, 2005.

KJELLEBERG, S.; STEINBERG, P.; GIVSKOV, M.; GRAM, L.; MANEFIELD, M.; DENYS, R. Do marine natural products interfere with prokaryotic AHL regulatory systems? *Aquatic Microbial Ecology*, v. 13, p. 85-93, 1997.

KLEBANOFF, M. A.; CAREY, J. C.; HAUTH, J. C.; HILLIER, S. L.; NUGENT, R. P.; THOM, E. A.; ERNEST, J. M.; HEINE, R. P.; WAPNER, R. J.; TROUT, W.; MOAWAD, A.; MIODOVNIK, M.; SIBAI, B. M.; DORSTEN, J. P. V.; DOMBROWSKI,

M. P.; O'SULLIVAN, M. J.; VARNER, M.; LANGER, O.; MCNELLIS, D.; ROBERTS, J. M.; LEVENO, K. J. The national institute of child health human development network of maternal-fetal medicine units. Failure of metronidazole to prevent preterm delivery among pregnant women with asymptomatic *Trichomonas vaginalis* infection. *New England Journal of Medicine*, v. 345, p. 487-493, 2001.

KOHLMEYER, J.; KOHLMEYER, E. *Marine Mycology. The Higher Fungi*. Academic Press: Nova Iorque, 1979.

KOOPMANS, M.; MARTENS, D.; WIJFFELS, R. H. Towards Commercial Production of Sponge Medicines. *Marine Drugs*, v. 7, p. 787-802, 2009.

KOPPLE, K. D.; MARR, D. H. Conformation of Cyclic Dipeptides. The folding of cyclic dipeptides containing an aromatic side chain. *Journal of the American Chemical Society*, v. 89, n. 24, p. 6193-6200, 1967.

KUILE, B. H. Metabolic adaptation of *Trichomonas vaginalis* to growth rate and glucose availability. *Microbiology*, v. 142, p. 3337-3345, 1996.

KUPKA, J.; ANKE, T.; STEGLICH, W.; ZEHLIN, L. The Antibiotics from Basidiomycetes. XI The biological activity of Siccayne, isolated from the marine fungus *Halocyphina villosa* J. E. E. Kohlmeyer. *Journal of Antibiotics*, v. 34, n. 3, p. 298-304, 1981.

LAM, K. S. New aspects of natural products in drug discovery. *Trends in Microbiology*, v. 15, n. 6, p. 279-289, 2007.

LERNER, C.; SCHAPOVAL, E. E. S.; MOTHE, B.; HENRIQUES, A. T.; SCHWARTSMANN, G.; MANS, D. Anticancer screening of south Brazilian marine sponges. In: 10th NCI-EORTC symposium on new drugs in cancer therapy, 1998, AMSTERDAM. *Annals of Oncology*, v. 9, p. 35, 1998a.

LERNER, C.; SCHAPOVAL, E. E. S.; MOTHE, B.; RECH, E.; FARIAS, F. M.; HENRIQUES, A. T. Antimicrobial activity of sponges from southern Brazil Atlantic Coast Brazilian marine sponges. In: *5th International Sponge Symposium*, 1998, SIDNEY. p. 40-41, 1998b.

LEWIS, K. Persister cells and the riddle of biofilm survival. *Biochemistry*, v. 70, n. 2, pp. 267-274, 2005.

LHULLIER, C.; FALKENBERG, M.; IOANNOU, E.; QUESADA, A.; PAPAZAFIRI, P.; HORTA, P. A.; SCHENKEL, E. P.; VAGIAS, C.; ROUSSIS, V. Cytotoxic halogenated metabolites from the Brazilian red alga *Laurencia catarinensis*. *Journal of Natural Products*, v. 73, n. 1, p. 27-32, 2010.

LI, Q., WANG, G. Diversity of fungal isolates from three Hawaiian marine sponges. *Microbiological Research*, v. 164, n. 2, p. 233-241, 2009.

LI, Z. Advances in marine microbial symbionts in the china sea and related pharmaceutical metabolites. *Marine Drugs*, v. 7, p. 113-129, 2009.

LI, J.; WANG, W.; XU, S. X.; MAGARVEY, N. A.; MCCORMICK, J. K. *Lactobacillus reuteri*-produced cyclic dipeptides quench *agr*-mediated expression of toxic shock syndrome toxin-1 in staphylococci. *PNAS*, v. 108, n. 5, p. 3360-3365, 2011.

LIRA, S. P. *Metabólitos Secundários Biologicamente Ativos Isolados de Esponjas Marinhas e do fungo Beauveria felina de Origem Marinha*. Tese. São Carlos: Universidade de São Paulo, 2007. 151p.

LIRA, S. P.; VITA-MARQUES, A. M.; SELEGHIM, M. H. R.; BUGNI, T. S.; LABARBERA, D. V.; SETTE, L. D.; SPONCHIADO, S. R. P.; IRELAND, C. M.;

BERLINCK, R. G. S. New Destruxins from the Marine-derived Fungus *Beauveria felina*. *The Journal of Antibiotics*, v. 59, 553-563, 2006.

LIU, X.; ASHFORTH, E.; REN, B.; SONG, F.; DAI, H.; LIU, M.; WANG, J.; XIE, Q.; ZHANG, L. Bioprospecting microbial natural product libraries from the marine environment for drug discovery. *The Journal of Antibiotics*, v. 63, p. 415-422, 2010.

MAH, T. F.; O'TOOLE, G. A. Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. *Trends in Microbiology*, v. 9, n. 1, p. 34-39, 2001.

MANCINI, I.; DEFANT, A.; GUELLA, G. Recent synthesis of marine natural products with antibacterial activities. *Anti-Infective Agents in Medicinal Chemistry*, v. 6, p. 17-48, 2007.

MANEFIELD, M.; NYS, R.; NARESH, K.; ROGER, R.; GIVSKOV, M.; PETER, S.; KJELLEBERG, S. Evidence that halogenated furanones from *Delisea pulchra* inhibit acylated homoserine lactone (AHL)-mediated gene expression by displacing the AHL signal from its receptor protein. *Microbiology*, v. 145, p. 283-291, 1999.

MARESSO, A. W.; SCHNEEWIND, O. Sortase as a Target of Anti-Infective Therapy. *Pharmacological Reviews*, v. 60, p. 128-141, 2008.

MARINLIT 2011 Database. Acesso em 20 de dezembro de 2011. Disponível em <http://www.chem.canterbury.ac.nz/marinlit/marinlit.shtml>

MARTIN, C. A.; HOVEN, A. D.; COOK, A. M. Therapeutic frontiers: preventing and treating infectious diseases by inhibiting bacterial quorum sensing. *European Journal of Clinical Microbiology e Infectious Diseases*, v. 2, p. 635-642, 2008.

MARTINS, M. B.; CARVALHO, I. Diketopiperazines: biological activity and synthesis. *Tetrahedron*, v. 63, n. 40, p. 9923-9932, 2007.

MAYER, A. M. S.; HAMANN, M. T. Marine pharmacology in 2001–2002: Marine compounds with anthelmintic, antibacterial, anticoagulant, antidiabetic, antifungal, anti-inflammatory, antimalarial, antiplatelet, antiprotozoal, antituberculosis, and antiviral activities; affecting the cardiovascular, immune and nervous systems and other miscellaneous mechanisms of action. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology e Pharmacology*, v. 140, n. 3-4, p. 265-286, 2005.

MAYER, A. M. S.; GLASER, K. B.; CUEVAS, C.; JACOBS, R. S.; KEM, W.; LITTLE, R. D.; MCINTOSH, J. M.; NEWMAN, D. J.; POTTS, B. C.; SHUSTER, D. E. The odyssey of marine pharmaceuticals: a current pipeline perspective. *Trends in Pharmacological Sciences*, v. 31, p. 255-265, 2010.

MENEZES, C. B. A.; BONUGLI-SANTOS, R. C.; MIQUELETTO, P. B.; PASSARINI, M. R. Z.; SILVA, C. H. D.; JUSTO, M. R.; LEAL, R. R.; FANTINATTI-GARBOGGINI, F.; OLIVEIRA, V. M.; BERLINCK, R. G. S.; SETTE, L. D. Microbial diversity associated with algae, ascidians and sponges from the north coast of São Paulo state, Brazil. *Microbiological Research*, v. 165, n. 6, p. 466-482, 2010.

MIAO, L., QIAN, P.-Y. Antagonistic antimicrobial activity of marine fungi and bacteria isolated from marine biofilm and seawaters of Hong Kong. *Aquatic Microbial Ecology*, v. 38, p. 231-238, 2005.

MIAO, L.; KWONG, T. F. N.; QIAN, P.-Y. Effect of culture conditions on mycelial growth, antibacterial activity, and metabolite profiles of the marine-derived fungus *Arthrinium c.f. saccharicola* *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 72, p. 1063-1073, 2006.

MILLER, M. B.; BASSLER, B. L. Quorum sensing in bacteria. *Annual Reviews of Microbiology*, v. 55, p. 165-99, 2001.



MOLINSKI, T. F.; DALISAY, D. S.; LIEVENS, S. L.; SALUDES, J. P. Drug development from marine natural products. *Nature Reviews: Drug Discovery*, v. 8, n. 1, p. 69-85, 2009.

MONKS, N.; LERNER, C.; HENRIQUES, A. T.; FARIAS, F. M.; SCHAPOVAL, E. E. S.; SUYENAGA, E. S.; SCHWARTSMANN, G.; MOTHE, B.. Anticancer, antichemotactic and antimicrobial activities of marine sponges collected off the coast of Santa Catarina, southern Brazil. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, v. 212, p. 1-12, 2002.

MORRISON-GARDINER, S. Dominant fungi from Australian coral reefs. *Fungal Diversity*, v. 9, p. 105-21, 2002.

MURICY, G.; HADJU, E. *Porífera Brasilis: Guia de Identificação das Esponjas mais comuns do Sudeste do Brasil*. Rio de Janeiro: Museu Nacional, 2006. p. 15-23.

MURICY, G.; SILVA, O. C. Esponjas marinhas do Estado do Rio de Janeiro: um recurso renovável inexplorado. In: SILVA, S. H. G.; LAVRADO, H. P. (eds). *Ecologia dos Ambientes Costeiros do Estado do Rio de Janeiro*. Série Oecologia Brasiliensis, v. 2. PPGE-UFRJ. 1999. pp. 155-178.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M.; SNADER, K. M. The influence of Natural Products upon drug discovery. *Natural Product Reports*, v. 17, n. 3, p. 215-234, 2000.

NI, M.; ZHOU, X. Y.; HE, X.; GU, Q. Q. A novel hemiacetal from the marine-derived fungus *Penicillium citrinum*. *Yao Xue Xue Bao*. v. 46, p. 1098-1100, 2011.

NIH – National Institute of Health. SBIR/STTR Study and Control of Microbial Biofilms. Acesso em 10 de novembro de 2011. Disponível em: <http://grants.nih.gov/grants/guide/pa-files/PA-99-084.html>, 1999.

NIKU-PAAVOLA, M.-L.; LAITILA, A.; MATTILA-SANDHOLM, T.; HAIKARA, A. New types of antimicrobial compounds produced by *Lactobacillus plantarum*. *Journal of Applied Microbiology*, v. 86, p. 29-35, 1999.

NORCROSS, R. D.; PATERSON, I. Total synthesis of bioactive marine macrolides. *Chemical Reviews*, v. 95, p. 2041-2114, 1995.

O'TOOLE, G.; KAPLAN, H. B.; KOLTER, R. Biofilm formation as microbial development. *Annual Review of Microbiology*, v. 54, p. 49-79, 2000.

OTTO, M. Quorum-sensing control in Staphylococci – a target for antimicrobial drug therapy? *FEMS Microbiology Letters*, v. 241, p. 135-141, 2004.

PAFFETTI, D.; BARBERIO, C.; CASALONE, E.; CAVALIERI, D.; FANI, R.; FIA, G.; MORI, E.; POLSINELLI, M. DNA fingerprinting by random amplified polymorphic DNA and restriction fragment length polymorphism is useful for yeast typing *Research in Microbiology*, v. 146, n. 7, p. 587-594, 1995.

PAUL, V. J.; PUGLISI, M. P. Chemical mediation of interactions among marine organisms. *Natural Product Reports*, v. 21 ,p. 189-209, 2004.

PAUL, V. J.; PUGLISI, M. P.; RITSON-WILLIAMS, R. Marine chemical ecology. *Natural Product Report*, v. 23, p. 153-180, 2006.

PETRIN, D.; DELGATY, K.; BHATT, R.; GARBER, G. Clinical and microbiological aspects of *Trichomonas vaginalis*. *Clinical Microbiology Reviews*, v. 11, p. 300-317, 1998.

PIETRA, F. Marine-derived fungi: a chemically and biologically diverse group of microorganisms. *Natural Product Reports*, v. 14, p. 453 – 464, 1997.

PIMENTEL-ELARDO, S. M.; KOZYTSKA, S.; BUGNI, T. S.; IRELAND, C. M.; MOLL, H.; HENTSCHEL, U. Anti-Parasitic Compounds from *Streptomyces* sp. Strains Isolated from Mediterranean Sponges. *Marine Drugs*, v. 8, p. 373-380, 2010.

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, n. 1, p. 46-61, 2002.

PITTAYAKHAJONWUT, P.; THEERASILP, M.; KONGSAEREE, P.; RUNGROD, A.; TANTICHAROEN, M.; THEBTARANONTH, Y. Pughiiin A, a Sesquiterpene from the fungus *Kionochaetae pughii* BCC3878. *Planta Medica*, v. 68, p. 1017-1019, 2002.

PRAY, E. G. The effects of various bacteria and their metabolites on growth of *Trichomonas vaginalis* in vitro. *The Journal of Parasitology*, v. 38, n. 5, p. 398, 1952.

PROJAN, S. J. Why is big Pharma getting out of antibacterial drug discovery? *Current Opinion in Microbiology*, v. 6, n. 5, p. 427-430, 2003.

PROKSCH, P.; EDRADA, R. A.; EBEL, R. Drugs from the seas – current status and microbiological implications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 59, p. 125–134, 2002.

PROKSCH, P.; EDRADA, R.; EBEL, R. Drugs from the Sea - opportunities and obstacles. *Marine Drugs*, v. 1, p. 5-17, 2003.

PROKSCH, P.; EBEL, R.; EDRADA, R.; RIEBE, F.; LIU, H.; DIESEL, A.; BAYER, M.; LI, X.; LIN, W. H.; GREBENYUK, V.; MÜLLER, W. E. G.; DRAEGER, S.; ZUCCARO, A.; SCHULZ, B. Sponge-associated fungi and their bioactive compounds: the *Suberites* case. *Botanica Marina*, v. 51, n. 3, p. 209-218, 2008.

RASKO, D. A.; MOREIRA, C. G.; LI, D. R.; READING, N. C.; RITCHIE, J. M.; WALDOR, M. K.; WILLIAMS, N.; TAUSSIG, R.; WEI, S.; ROTH, M.; HUGHES, D. T.;

HUNTLEY, J. F.; FINA, M. W.; FALCK, J. R.; SPERANDIO, V. Targeting QseC signaling and virulence for antibiotic development. *Science*, v. 321, p. 1078-1080, 2008.

RASKO, D. A.; SPERANDIO, V. Anti-virulence strategies to combat bacteria-mediated disease. *Nature Reviews: Drug Discovery*, v. 9, p. 117-128, 2010.

RASMUSSEN, T. B.; GIVSKOV, M. Quorum-sensing inhibitors as anti-pathogenic drugs. *International Journal of Medical Microbiology*, v. 296, 149-161, 2006.

READING, N. C.; SPERANDIO, V. Quorum sensing: the many languages of bacteria. *FEMS Microbiology Letters*, v. 254, p. 1-11, 2006.

RHEE, K. H. Cyclic dipeptides exhibit synergistic, broad spectrum antimicrobial effects and have anti-mutagenic properties. *International Journal of Antimicrobial Agents*, v. 24, n. 5, p. 423-427, 2004.

ROCHA, L. C.; FERREIRA, H. V.; PIMENTA, E. F.; BERLINCK, R. G. S.; REZENDE, M. O. O.; LANDGRAF, M. D.; SELEGHIM, M. H. R.; SETTE, L. D.; PORTO, A. L. M. Biotransformation of  $\alpha$ -bromoacetophenones by the marine fungus *Aspergillus sydowii*. *Marine biotechnology*. doi:10.1007/s10126-009-9241-y, 2009.

ROCHA, T. D.; VIEIRA, P. D.B.; GNOATTO, S. C. B.; TASCA, T.; GOSMANN, G. Anti-*Trichomonas vaginalis* activity of saponins from *Quillaja*, *Passiflora*, and *Ilex* species. *Parasitology Research*. DOI 10.1007/s00436-011-2798-1, 2012.

RYAN, R. P.; DOW, J. M. Diffusible signals and interspecies communication in bacteria. *Microbiology*, v. 154, n. 7, 1845-1858, 2008.

SALEEM, M.; ALI, M. S.; HUSSAIN, S.; JABBAR, A.; ASHRAF, M.; LEE, Y. L. Marine natural products of fungal origin. *Natural Product Reports*, v. 24, p. 1142-1152, 2007.

SALMOND, G. P.; WELCH, M. Antibiotic resistance: adaptive evolution. *Lancet*, v. 372, p. S97–S103, 2008.

SCHWEBKE, J. R.; BARRIENTES, F. J. Prevalence of *Trichomonas vaginalis* isolates with resistance to Metronidazole and Tinidazole. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 50, p. 4209-4210, 2006.

SHEARER, C. A.; DESCALS, E.; KOHLMAYER, B.; KOHLMAYER, J.; MARVANNOVA, L.; PADGETT, D.; PORTER, D.; RAJA, H. A.; SCHMIT, J. P.; THORTON, H. A.; VOGLYMAYR, H. Fungal biodiversity in aquatic habitats. *Biodiversity and Conservation*, v.16, p. 49-67, 2007.

SILVA, A. C.; KRATZ, J. M.; SANTOS, J.; FARIAS, F. M.; HENRIQUES, A. T.; LERNER, C.; MOTHES, B.; BARARDI, C. R. M.; SIMOES, C. M. O. *In vitro* antiviral activity of marine sponges collected of Brazilian coast. *Biological e Pharmaceutical Bulletin*, v. 29, n. 1, p. 135-140, 2006.

SILVEIRA, G. P.; NOME, F.; GESSER, J. C.; SÁ, M. M.; TEREZI, H. Estratégias utilizadas no combate a resistência bacteriana. *Química Nova*, v. 29, n. 4, p. 844-855, 2006.

SIMÕES, M.; BENNETT, R.; ROSA, E. A. S. Understanding antimicrobial activities of phytochemicals against multidrug resistant bacteria and biofilms. *Natural Product Reports*, v. 26, p. 746–757, 2009.

SIMMONS, K. J.; CHOPRA, I.; FISHWICK, C. W. G. Structure-based discovery of antibacterial drugs. *Nature Reviews Microbiology*, v. 8, p. 501-510, 2010.

SIPKEMA, D.; OSINGA, R.; SCHATTON, W.; MENDOLA, D.; TRAMPER, J.; WIJFFELS, R. H. Large-scale production of pharmaceuticals by marine sponges: sea, cell, or synthesis? *Biotechnology and Bioengineering*, v. 90, n. 2, p. 201-222, 2005.

SONG, M. K.; HWANG, I. K.; ROSENTHAL, M. J.; HARRIS, D. M.; YAMAGUCHI, D. T.; YIP, I.; GO, V. L. W. Anti-hyperglycemic activity of zinc plus cyclo(His-Pro) in genetically diabetic goto-kakizaki and aged rats. *Experimental Biology and Medicine*, v. 228, n. 11, p. 1338-1345, 2003.

SORVILLO, F.; KERNDT, P. *Trichomonas vaginalis* and amplification of HIV-1 transmission. *Lancet*, v. 351, p. 213-214, 1998.

SORVILLO, F.; SMITH, L.; KERNDT, P.; ASH, L. *Trichomonas vaginalis*, HIV, and Africans. *Emergent Infectious Disease*, v. 7, p. 927-932, 2001.

SPELLBERG, B.; POWERS, J. H.; BRASS, E. P.; MILLER, L. G.; EDWARDS, J. E. Jr. Trends in antimicrobial drug development: implications for the future. *Clinical Infectious Diseases*. v. 38, n. 9, p. 1279-86, 2004.

SPELLBERG, B.; GUIDOS, R.; GILBERT, D.; BRADLEY, J.; BOUCHER, H. W.; SCHELD, W. M.; BARTLETT, J. G.; EDWARDS JR, J. The Epidemic of Antibiotic-Resistant Infections: A Call to Action for the Medical Community from the Infectious Diseases Society of America. *Clinical Infectious Diseases*, v. 46, p. 155–64, 2008.

STEWART, P. S.; COSTERTON, J. W. Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. *The Lancet*, v. 358, p. 135–138, 2001.

STEWART, P. S. Mechanisms of antibiotic resistance in bacterial biofilms. *International Journal of Medical Microbiology*, v. 292, p. 107-113, 2002.

SUGUNA, K.; RAMAKUMAR, S. Structure of cyclo(-L-Leucyl-L-tyrosyl-) Monohydrate,  $C_{15}H_{20}N_2O_3 \cdot H_2O$ . *Acta Crystallographica*, v. C40, p. 2053-2056, 1984.

SUN, X.; ZHOU, X.; CAI, M.; TAO, K.; ZHANG, Y. Identified biosynthetic pathway of aspergiolide A and a novel strategy to increase its production in a marine-derived fungus *Aspergillus glaucus* by feeding of biosynthetic precursors and inhibitors simultaneously. *Bioresource Technology*, v. 100, p. 4244–4251, 2009.

TAGA, M. E.; BASSLER, B. L. Chemical communication among bacteria. *PNAS*, v. 100, p. 14549-14554, 2003.

TAKAHASHI, J. A.; LUCAS, E. M. F. Ocorrência e diversidade estrutural de metabólitos fúngicos com atividade antibiótica. *Química Nova*, v. 31, n. 7, p. 1807-1813, 2008.

TAYLOR, M. W.; SCHUPP, P. J.; DAHLLÖF, I.; KJELLEBERG, S.; STEINBERG, P. D. Host specificity in marine sponge-associated bacteria, and potential implications for marine microbial diversity. *Environmental Microbiology*, v. 6, n. 2, p. 121-30, 2004.

TAYLOR, M. W.; RADAX, R.; STEGER, D.; WAGNER, M. Sponge-associated microorganisms: evolution, ecology, and biotechnological potential. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, p. 295–347, 2007.

TENOVER, F. C. Mechanisms of antimicrobial resistance in bacteria. *The American Journal of Medicine*, v.119, p. S3-S10, 2006.

THAKUR, N. L.; JAIN, R.; NATALIO, F.; HAMER, B.; THAKUR, A. N.; MÜLLER, W. E. G. Marine molecular biology: An emerging field of biological sciences. *Biotechnology Advances*, v. 26, n. 3, p. 233-245, 2008.

TIMSIT, J.-F.; DUBOIS, Y.; MINET, C.; BONADONA, A.; LUGOSI, M.; ARA-SOMOHANO, C.; HAMIDFAR-ROY, R.; SCHWEBEL, C. New materials and devices for preventing catheter-related infections. *Annals of Intensive Care*, v. 1, p. 34-43, 2011.

TRENTIN, D. S. *Bactéria associada à esponja marinha como fonte de metabólitos bioativos: atividade antibiofilme e antimicrobiana*. Dissertação. Porto Alegre: UFRGS, 2009. 92 p.

TURQUE, A. S.; CARDOSO, A. M.; SILVEIRA, C. B.; VIEIRA, R. P.; FREITAS, F. A. D.; ALBANO, R. M.; GONZALEZ, A. M.; PARANHOS, R.; MURICY, G.; MARTINS, O. B. Bacterial communities of the marine sponges *Hymeniacidon heliophila* and *Polymastia janeirensis* and their environment in Rio de Janeiro, Brazil. *Marine Biology*, v. 155, p. 135–146, 2008.

UEDA, J.-Y.; HASHIMOTO, J.; INABA, S.; TAKAGI, M.; SHIN-YA, K. JBIR-59, a new sorbicillinoid, from a marine-derived fungus *Penicillium citrinum* Spl080624G1f01. *The Journal of Antibiotics*, v. 63, p. 203-205, 2010.

UPCROFT, J. A.; DUNN, L. A.; WRIGHT, J.M.; BENAKLI, K.; UPCROFT, P.; VANELLE, P. 5-Nitroimidazole drugs effective against metronidazole-resistant *Trichomonas vaginalis* and *Giardia duodenalis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 50, p. 344-347, 2006.

VENTURI, V. Regulation of quorum sensing in *Pseudomonas*. *FEMS Microbiology Reviews*, v. 30, n. 2, p. 274-291, 2006.

VIIKKI, M.; PUKKALA, E.; NIEMINEN, P.; HAKAMA, M. Gynaecological infections as risk determinants of subsequent cervical neoplasia. *Acta Oncológica*, v. 39, p. 71-75, 2000.

VITA-MARQUES, A. M.; LIRA, S. P.; BERLINCK, R. G. S.; SELEGHIM, M. H. R.; SPONCHIADO, S. R. P.; TAU-K-TORNISIELO, S. M.; BARATA, M.; PESSOA, C.; DE MORAES, M. O.; CAVALCANTI, B. C.; NASCIMENTO, G. G. F.; DE SOUZA, A. O.; GALETTI, F. C. S.; SILVA, C. L.; SILVA, M.; PIMENTA, E. F.; THIEMANN, O.; PASSARINI, M. R. Z.; SETTE, L. D. A multi-screening approach for marine-derived



fungal metabolites and the isolation of cyclodepsipeptides from *Beauveria felina*. *Química Nova*, v. 31, n. 5, p. 1099-1103, 2008.

WANG, G. Diversity and biotechnological potential of the sponge-associated microbial consortia. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, v. 33, p. 545-551, 2006.

WANG, G.; LI, Q.; ZHU, P. Phylogenetic diversity of culturable fungi associated with the Hawaiian Sponges *Suberites zeteki* and *Gelliodes fibrosa*. *Antonie van Leeuwenhoek*, v. 93, p. 163-174, 2008.

WANG, Y.-N.; SHAO, C.-L.; ZHENG, C.-J.; CHEN, Y.-Y.; WANG, C.-Y. Diversity and antibacterial activities of fungi derived from the gorgonian *Echinogorgia rebekka* from the South China Sea. *Marine Drugs*, v. 9, p. 1379-1390, 2011.

WATERS, C. M.; BASSLER, B. L. Quorum Sensing: Cell-to-Cell Communication in Bacteria. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, v. 21, p. 319–346, 2005.

WEI, R.; LI, F.; SONG, R.; QIN, S. Comparison of two marine sponge-associated *Penicillium* strains DQ25 and SC10: differences in secondary metabolites and their bioactivities. *Annals of Microbiology*, v. 59, n. 3, p. 579-585, 2009.

WHITEHEAD, N. A.; BARNARD, A. M.; SLATER, H.; SIMPSON, N. J.; SALMOND, G. P. Quorum-sensing in Gram-negative bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*, v. 25, n. 4, p. 365-404, 2001.

WHO - World Health Organization. Global Prevalence and Incidence of Selected Curable Sexually Transmitted Infections. Overview and Estimates, WHO/HIV\_AIDS/2001.02 and WHO/CDS/CSR/EDC/2001.10. World Health Organization, Geneva, 2001.

WHO - World Health Organization. The top 10 causes of death. 2011. Acesso em 08 de janeiro de 2012. Disponível em <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs310/em/index.html>.

XIAO, Q.; PEI, D. High-throughput synthesis and screening of cyclic peptide antibiotics. *Journal of Medicinal Chemistry*, v. 50, n. 13, p. 3132-3137, 2007.

ZHANG, Y.; MU, J.; FENG, Y.; GU, X.; ZHANG, Y. Marine fungi inhibiting methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and their molecular taxonomy. 5th *International Conference on Bioinformatics and Biomedical Engineering*, (iCBBE). doi: 10.1109/icbbe.2011.5780075. 2011.

ZHOU, L.-N.; ZHU, T.-J.; CAI, S.-X.; GU, Q.-Q.; LI, D.-H. Three new indole-containing diketopiperazine alkaloids from a deep-ocean sediment derived fungus *Penicillium griseofulvum*. *Helvetica Chimica Acta*, v. 93, p. 1758-1763, 2010.