

**Atividade Antibiofilme da Cumarina frente *Pseudomonas Aeruginosa*****Antibiofilm Activity of Cumarina front *Pseudomonas Aeruginosa***

DOI:10.34117/bjdv6n10-231

Recebimento dos originais: 13/09/2020

Aceitação para publicação: 13/10/2020

**Carolina Urquhart**

Aluno de graduação

E-mail: carolinagonzalezurquhart@gmail.com

**Augusto Dias da Mota**

Estudante de graduação

E-mail: auguxtomota@hotmail.com

**Felipe Zarzicki**

Estudante de graduação

E-mail: felipe.feelipe@gmail.com

**Camila Casagrande**

Estudante de graduação

E-mail: camilacasagrande@gmail.com

**Camilla Filippi dos Santos Alves**

Aluno de pós-graduação

E-mail: camillafilippibio@gmail.com

**Dariane Jornada Clereci**

Aluno de pós-graduação

E-mail: dariane\_clereci@hotmail.com

**Ticiane da Rosa Pinheiro**

Aluno de pós-graduação

E-mail: ticianerp@yahoo.com.br

**Pauline Cordenonsi Bonez**

Aluno de pós-graduação

E-mail: Pauline-cb@hotmail.com

**Thais de Moares Barin**

Aluno de pós-graduação

E-mail: thaty\_barin@hotmail.com

**Roberto Christ Vianna Santos**

Docente

E-mail: robertochrist@gmail.com

**RESUMO**

A utilização inadequada de fármacos antimicrobianos desencadeou o aumento de cepas resistentes aos tratamentos. Este cenário se torna mais preocupante quando os microrganismos se apresentam na forma de biofilme. Os biofilmes são estruturas complexas de aglomerados microbianos, protegidos por uma camada de exopolissacarídeos (EPS) que impede a penetração dos fármacos, dificultando ainda mais o tratamento das infecções. Com isso, o emprego de plantas medicinais como alternativa de tratamento antimicrobiano está crescendo no mercado farmacêutico, pois estas possuem metabólitos secundários, que são os principais responsáveis pelas atividades biológicas das plantas. Tendo em vista os metabólitos secundários como fonte de pesquisa, em nosso estudo, destacamos a classe das cumarinas, que são compostos fenólicos presentes em uma vasta diversidade de vegetais e possui relatos de atividades antimicrobiana, antioxidante e antiviral. Diante disso, este estudo tem por objetivo avaliar a atividade antibiofilme da cumarina frente a biofilme formado por *P. aeruginosa* (PA01). A atividade antibiofilme foi avaliada por técnica semi-quantitativa em placas de 96 poços. O biofilme foi revelado utilizando solução de cristal violeta e o biofilme solubilizado foi submetido à leitura em 570nm. Além disso, foi realizada a contagem de células sésseis. Os resultados observados demonstraram que a cumarina é capaz de inibir a formação do biofilme em até 78% e reduzir a contagem de colônias sésseis. Haja vista esses resultados, a cumarina apresenta significativamente atividade antibiofilme, com isso sugerimos que esta substância pode ser utilizada como alternativa de tratamento para infecções que envolvem a formação de biofilmes.

**Palavras-chave:** Biofilme, cumarina e *Pseudomonas aeruginosa*.

**ABSTRACT**

The inappropriate use of antimicrobial drugs has triggered the increase of strains resistant to treatment. This scenario becomes more worrying when the microorganisms present themselves in the form of biofilm. Biofilms are complex structures of microbial clusters, protected by a layer of exopolysaccharides (EPS) that prevents the penetration of drugs, making the treatment of infections even more difficult. With this, the use of medicinal plants as an alternative of antimicrobial treatment is growing in the pharmaceutical market, because they have secondary metabolites, which are the main responsible for the biological activities of the plants. Taking into account the secondary metabolites as a source of research, in our study we highlighted the class of coumarins, which are phenolic compounds present in a vast diversity of plants and have reports of antimicrobial, antioxidant and antiviral activities. In view of this, this study aims to evaluate the antibiotic activity of coumarin against biofilm formed by *P. aeruginosa* (PA01). The antibiotic activity was evaluated by semi-quantitative technique in plates of 96 wells. The biofilm was revealed using violet crystal solution and the solubilized biofilm was read at 570nm. In addition, the sessile cell count was performed. The observed results showed that coumarin is able to inhibit biofilm formation up to 78% and reduce sessile colonies count. In view of these results, coumarin has significant antibiotic activity, so we suggest that this substance can be used as an alternative treatment for infections involving the formation of biofilm.

**Keywords:** Biofilm, coumarin and *Pseudomonas aeruginosa*.

**1 INTRODUÇÃO**

O uso desregrado dos antimicrobianos atualmente disponíveis vem contribuindo, de forma preponderante, para a aquisição da resistência microbiana aos tratamentos, acarretando no aumento dos índices de mortalidade e morbidade de pacientes com infecções microbianas (FRIEDRICH et al., 2016; NEVES et al., 2011; WANNMACHER, 2004). Esse quadro torna-se mais preocupante quando os microrganismos se apresentam na forma de biofilme, o qual se configura por ser uma complexa estrutura aderida a superfícies bióticas e abióticas, onde as células microbianas encontram-se envoltas por uma matriz autoproduzida de exopolissacarídeos (EPS) que dificulta a entrada e ação dos antimicrobianos. A formação de biofilme tem grande impacto para saúde, uma vez que podem ser formados em materiais cirúrgicos, próteses e no interior de cateteres venosos e urinários (DONLAN; COSTERTON, 2002; MAUNDERS; WELCH, 2017; PENG et al., 2018). O biofilme pode ser formado por microrganismos da mesma ou de diferentes espécies. Neste estudo, abordamos a formação de biofilme de *P. aeruginosa*, uma bactéria Gram negativa, conhecida por ser um patógeno oportunista, que acomete principalmente pacientes imunocomprometidos. Além disso, *P. aeruginosa* está freqüentemente associado a infecções do trato urinário e do sistema respiratório, assim como dermatites, infecções dos tecidos moles, bacteremia e uma variedade de infecções sistêmicas (PACZKOWSKI et al., 2017; SELEZSKA et al., 2012).

Tendo em vista as dificuldades encontradas para o tratamento de infecções que envolvem formação de biofilme, novas alternativas terapêuticas têm sido exploradas para tentar conter infecções persistentes. Neste contexto, destacam-se os compostos fenólicos que estão presentes em uma vasta variedade de vegetais e são os principais responsáveis pelas atividades biológicas das plantas (BEN YAKOUB et al., 2018; SLOBODNÍKOVÁ et al., 2016). A curamina é uma classe de compostos fenólicos que apresenta em sua estrutura um anel aromático 1,2 benzopironas e um benzeno fundido ao anel de a-pirona (BASILE et al., 2009; SANDHU et al., 2014). Apesar de ser originalmente encontradas em *tonka bean* (*Dipteryx odorata Wild*), as cumarinas estão distribuídas em quase 30 famílias e 150 espécies de plantas e são caracterizadas por possuírem baixo peso molecular, serem facilmente sintetizadas e apresentarem alta biodisponibilidade e baixa toxicidade (LUCHINI et al., 2008; REEN et al., 2018). Devido às diversas atividades biológicas, as cumarinas e seus derivados apresentam-se como uma importante fonte de pesquisas. Suas atividades farmacológicas mais estudadas são: anti-HIV, antitumoral, anti-hipertensivo, anti-inflamatório, analgésico e antimicrobiano (KERI et al., 2015; SANDHU et al., 2014). Diante disso, este trabalho tem por objetivo avaliar a atividade antibiofilme da curamina frente a biofilme formado por *P. aeruginosa* (PA01).

## 2 METODOLOGIA

O composto fenólico cumarina simples foi obtida comercialmente (Sigma Chemical®).

### 2.1 INIBIÇÃO DE BIOFILME

A suspensão bacteriana de *P. aeruginosa* PA01 foi realizada caldo Muller Hinton. A cultura foi diluída 1: 100 em Muller Hinton e pipetados 100µl de cada diluição para os poços numa placa de 96 poços estéril de fundo plano e tratados com concentrações subinibitórias da cumarina (0,37µg/ml e 0,185µg/ml). Após incubação por 24h a 37 °C, os microrganismos

planctônicos foram removidos dos poços e lavados com água destilada por três vezes. A revelação do biofilme foi realizada utilizando 200 µL de solução violeta de cristal a 0,1% (Sigma Chemical®) em cada poço. As microplacas foram lavadas com água destilada e secas ao ar. Para solubilizar o biofilme, foram adicionados 200 µ L de etanol a 95%. A solução foi transferida para uma nova placa de microtitulação e a formação do biofilme foi revelada medindo a absorbância a 570 nm em leitor de microplacas. Para o controle positivo, foi utilizado o caldo de cultura e o inóculo de *P. aeruginosa* e para o controle negativo somente o meio (DOS SANTOS ALVES et al., 2016).

### 2.2 CONTAGEM DE COLÔNIAS SÉSSEIS

O biofilme foi formado em placa de 96 poços e tratado com concentrações subinibitórias da cumarina (0,37µg/ml e 0,185µg/ml). Após o tempo de incubação a placa foi lavada duas vezes em PBS para remover as células fracamente ligadas e o biofilme foi então ressuspensão. A placa com o biofilme formado foi submetida à agitação vigorosa em vortex por 5 min a fim de romper a matriz da estrutura. Após foram retiradas alíquotas dos poços e realizadas diluições decimais em série (em PBS). Em seguida essas diluições foram plaqueadas em placas contendo meio de cultura Mueller Hinton (Sigma Chemical®). Na sequencias as placas foram incubadas por 24h °C, o número de células cultiváveis de biofilme foi determinado pela contagem de unidades formadoras de colônias (CFUs) após ressuspensão de células de biofilme. Foram computadas as UFC totais por unidade de área (Log CFU/cm<sup>2</sup>) do poço da placa de microtitulação. Os experimentos foram repetidos em três ocasiões com amostras individuais avaliadas em triplicata (SILVA et al., 2010).

### 2.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados de densidade óptica obtidos no ensaio de formação de biofilme e contagem de unidades formadoras de colônias foram expressos em média ± erro padrão e submetidos ao teste

t, considerando-se diferença estatística quando  $p < 0,05$ . Para a realização dos gráficos, utilizou-se o software GraphPad Prism® 5.

### 3 RESULTADOS e DISCUSSÃO

Os resultados obtidos demonstraram que, em concentrações subinibitórias, a cumarina é capaz de inibir a formação de biofilme em até 78% em comparação com o controle positivo, como mostra a Figura 1. Nas mesmas concentrações a cumarina reduziu significativamente a contagem de colônias sésseis comparado com o controle positivo, conforme demonstrado na Figura 2.

Figura 1 - Ação da cumarina concentrações subinibitórias sobre biofilme *P. aeruginosa PA01* em comparação com o controle positivo (C+) e o controle negativo (C-).

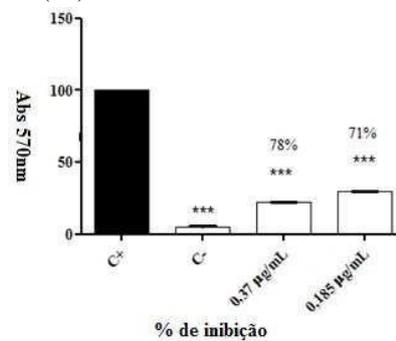
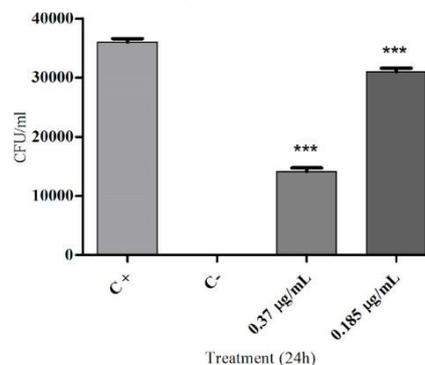


Figura 2 - Contagem de colônias sésseis de *P. aeruginosa PA01* frente à cumarina, em concentrações subinibitórias, em comparação com o controle positivo (C+) e controle negativo (C-).



A análise dos resultados, permite inferir que a cumarina demonstra significativa atividade antibiofilme. Segundo relatos da literatura esta substância apresenta uma potente atividade antimicrobiana e isso justifica-se pela presença de uma hidroxila livre no C-7, importante para atividade antibacteriana. Além disso, apresenta cadeias longas e planas que são mais lipofílicas e com isso penetram mais facilmente na membrana celular bacteriana (VENUGOPALA; RASHMI; ODHAV, 2013). Corroborando com os nossos resultados, alguns estudos relatam a atividade antibiofilme dos derivados de cumarina, inclusive frente a biofilme formado por *P. aeruginosa*.

Essa atividade também pode ser justificada pela capacidade da estrutura das cumarinas em inibir a sinalização *quorum sensing*, sendo esta, que a sinalização responsável por controlar a síntese de genes de resistência incluindo a capacidade de formar biofilmes (REEN et al., 2018; TAN et al., 2017; ZHANG et al., 2017).

#### **4 CONSIDERAÇÕES FINAIS**

Este trabalho apresentou resultados significativos frente à atividade antibiofilme da cumarina diante ao biofilme formado pela cepa *P. aeruginosa* PA01. Visto que a formação de biofilmes em dispositivos médicos configura um sério problema de saúde pública, pois as infecções persistem apesar dos tratamentos, é de extrema importância a pesquisa por compostos que sejam efetivos, principalmente derivados de produtos naturais. Diante dos resultados apresentados podemos sugerir que este composto fenólico, pode ser uma potente alternativa de tratamento para infecções que envolvem a formação de biofilme. Contudo, esses resultados são preliminares, necessitando de estudos adicionais a fim de elucidar o mecanismo de ação da cumarina sobre o biofilme bacteriano.

**REFERÊNCIAS**

BASILE, A. et al. Antimicrobial and antioxidant activities of coumarins from the roots of *Ferulago campestris* (apiaceae). **Molecules**, 2009.

BEN YAKOUB, A. R. et al. Flavonoids, phenols, antioxidant, and antimicrobial activities in various extracts from Tossa jute leaf (*Corchorus olitorus* L.). **Industrial Crops and Products**, v. 118, n. March, p. 206–213, 2018.

DONLAN, R. M.; COSTERTON, J. W. **Biofilms: Survival mechanisms of clinically relevant microorganisms** **Clinical Microbiology Reviews**, 2002.

DOS SANTOS ALVES, C. F. et al. Antimicrobial, antitrypanosomal and antibiofilm activity of *Equisetum hyemale*. **Microbial Pathogenesis**, v. 101, p. 119–125, 2016.

FRIEDRICH, K. et al. Microbiology and resistance in first episodes of spontaneous bacterial peritonitis: implications for management and prognosis. **Journal of gastroenterology and hepatology**, 2016.

KERI, R. S. et al. Recent progress in the drug development of coumarin derivatives as potent antituberculosis agents. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 100, p. 257–269, 2015.

LUCHINI, A. C. et al. Intestinal anti-inflammatory activity of coumarin and 4- hydroxycoumarin in the trinitrobenzenesulphonic acid model of rat colitis. **Biological & pharmaceutical bulletin**, 2008.

MAUNDERS, E.; WELCH, M. **Matrix exopolysaccharides; the sticky side of biofilm formation** **FEMS Microbiology Letters**, 2017.

NEVES, P. R. et al. *Pseudomonas aeruginosa* multirresistente: um problema endêmico no Brasil TT - Multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: an endemic problem in Brazil. **J. bras. patol. med. lab**, 2011.

PACZKOWSKI, J. E. et al. Flavonoids suppress *Pseudomonas aeruginosa* virulence through allosteric inhibition of quorum-sensing Receptors. **Journal of Biological Chemistry**, 2017.

PENG, L. Y. et al. Rutin inhibits quorum sensing, biofilm formation and virulence genes in avian pathogenic *Escherichia coli*. **Microbial Pathogenesis**, v. 119, p. 54–59, 2018.

REEN, F. J. et al. Coumarin: a novel player in microbial quorum sensing and biofilm formation inhibition. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 102, n. 5, p. 2063–2073, 2018.

SANDHU, S. et al. Coumarin hybrids as novel therapeutic agents. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 22, n. 15, p. 3806–3814, 2014.

SELEZSKA, K. et al. *Pseudomonas aeruginosa* population structure revisited under environmental focus: Impact of water quality and phage pressure. **Environmental Microbiology**, v. 14, n. 8, p. 1952–1967, 2012.

SILVA, S. et al. In vitro biofilm activity of non-Candida albicans Candida species. **Current Microbiology**, v. 61, n. 6, p. 534–540, 2010.

SLOBODNÍKOVÁ, L. et al. **Antibiofilm activity of plant polyphenols** *Molecules*, 2016.

TAN, N. et al. Antibacterial activities of pyrenylated coumarins from the roots of *Prangos hulusii*. **Molecules**, 2017.

VENUGOPALA, K. N.; RASHMI, V.; ODHAV, B. Review on Natural Coumarin; Compounds for Their Pharmacological Activity. **BioMed Research International**, v. 963248, n. Table 1, p. 14, 2013.

WANNMACHER, L. Uso indiscriminado de antibióticos e resistência microbiana: Uma guerra perdida? **Issn 1810-0791**, v. 1, n. 4, p. 1–5, 2004.

ZHANG, S. et al. Quorum sensing-disrupting coumarin suppressing virulence phenotypes in *Vibrio splendidus*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 2017.