



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ**  
**FACULDADE DE MEDICINA – *CAMPUS* SOBRAL**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**

**SIMONE TORRES DE OLIVEIRA**

**USO DO PEPTÍDEO SINTÉTICO LYS-A1 NO FAVORECIMENTO DA ATIVIDADE  
ANTIMICROBIANA DE CIPROFLOXACINA CONTRA *Pseudomonas aeruginosa*  
ATCC 9027**

**SOBRAL**

**2014**

SIMONE TORRES DE OLIVEIRA

USO DO PEPTÍDEO SINTÉTICO LYS-A1 NO FAVORECIMENTO DA ATIVIDADE  
ANTIMICROBIANA DE CIPROFLOXACINA CONTRA *Pseudomonas aeruginosa* ATCC  
9027

Dissertação de Mestrado apresentada ao  
Programa de Pós-Graduação em  
Biotecnologia, da Universidade Federal do  
Ceará, como requisito parcial para obtenção do  
título de Mestre em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Victor Alves Carneiro.

SOBRAL

2014

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação  
Universidade Federal do Ceará  
Biblioteca do Curso de Medicina – *Campus* de Sobral

- 
- O45u Oliveira, Simone Torres.  
    Uso do peptídeo sintético Lys-a1 no favorecimento da atividade antimicrobiana de ciprofloxacina contra *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027. / Simone Torres Oliveira. – 2014. 44 f. : il. color., enc. ; 30 cm.
- Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Curso de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Sobral, 2014.  
    Área de Concentração: Biotecnologia.  
    Orientação: Prof. Dr. Victor Alves Carneiro.
1. *Pseudomonas aeruginosa*. 2. Ciprofloxacina. I. Título.

---

CDD 660.6

SIMONE TORRES DE OLIVEIRA

USO DO PEPTÍDEO SINTÉTICO LYS-A1 NO FAVORECIMENTO DA ATIVIDADE  
ANTIMICROBIANA DE CIPROFLOXACINA CONTRA *Pseudomonas aeruginosa* ATCC  
9027

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Victor Alves Carneiro.

Aprovada em: 11/06/2014.

BANCA EXAMINADORA

---

Prof. Dr. Victor Alves Carneiro (Orientador)  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Prof. Dr. Rodrigo Maranguape Silva da Cunha  
Universidade Estadual Vale do Acaraú (UVA)

---

Profa. Dra. Lúcia Betânia da Silva Andrade  
Universidade Estadual Vale do Acaraú (UVA)

---

Prof. Dr. Eduardo Maffud Cilli  
Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho (UNESP)

À Deus e a minha filha Poliana, meus maiores motivos para sonhar, acreditar na vida e lutar por um mundo melhor.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, a Deus, por tudo de maravilhoso que tem me proporcionado, agradeço pela força e determinação que tive para enfrentar todos os desafios desta caminhada.

Aos meus pais, Antônio e Ana, pelo amor e apoio em todas as minhas decisões, por sempre estarem lutando para a minha formação e, sobretudo, para a minha felicidade.

Aos meus avós, Maria, Paulo (*in memoriam*), Josefa e Antônio (*in memoriam*), pelo carinho que sempre tiveram por me e pela maneira inigualável de me acolherem.

Aos meus irmãos, Ailton, Tiago (*in memoriam*), Paulo, Lucas e Ana Paula, pelo companheirismo. Tenho certeza de que eu nunca estarei só enquanto tivê-los comigo.

À minha filha Poliana, que, não poucas vezes, dividiu o sofrimento e a angústia dos dias ausentes e outras dificuldades enfrentadas para a minha formação.

Ao Bosco, pelo incentivo, apoio, paciência e amor. Por estar ao meu lado nesta importante etapa da minha vida, dividindo momentos de felicidades e de incertezas.

Ao meu sobrinho Tiago e a minha afilhada Maria Emyle, aos meus primos Davi e Isaias por me proporcionarem momentos de descontração.

Aos meus amigos Francidalva e Valcenildo, amigos fiéis, que com muito mais do que palavras, me apoiaram e me deram forças para vencer este desafio.

À minha tia Elionete e a minha “prima” Linara, testemunhas do meu esforço e dedicação para a realização deste projeto. Agradeço imensamente pelo apoio e incentivo.

Às minhas amigas, Clívia Andrade, Márcia Cristina e Otamires, pela amizade e pelo carinho que sempre tiveram a me e que vem superando a distância e o tempo.

Às minhas amigas, Idia e Ariana, pelo companheirismo e apoio incondicional nestes dois anos de curso. Deus, na sua infinita bondade nos uniu para que esta caminhada se tornasse menos árdua. As lembranças dos momentos de estudo, alegria, e até mesmo de dificuldade estarão para sempre comigo. Esta conquista também é de vocês.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Victor Alves Carneiro, por ter acreditado no meu potencial e ter me guiado na realização deste trabalho, sempre disposto a ensinar, educar e orientar com responsabilidade àqueles que se dedicam e estão determinados a prosseguir.

Ao Dr. Eduardo Maffud Cilli pela parceria com este grupo de pesquisa e pela colaboração dada a este trabalho.

Ao Prof. Dr. Rodrigo Maranguape Silva da Cunha pelo apoio, colaboração e por sempre estar disposto a ajudar e ensinar.

Aos professores do Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Ceará por todo o conhecimento compartilhado.

À Profa. Dra. Lúcia Betânia da Silva Andrade e ao Prof. Dr. Murilo Sérgio da Silva Julião, meus orientadores durante a graduação, por todas as oportunidades concedidas e pelo exemplo que são para a minha vida profissional e pessoal.

Aos colegas de turma do Mestrado, Tiago, Francisco, Tânia, Debora, Thales, Raulzito, José Sérgio, Katia e Taiã pela convivência durante estes dois anos.

À Universidade Federal do Ceará, em especial ao Programa de Pós Graduação em Biotecnologia, por terem me fornecido condições acadêmicas para a execução deste trabalho.

Ao Núcleo de Biotecnologia de Sobral (NUBIS), pela estrutura e suporte disponibilizado a este projeto, e ao Grupo de Biofilmes e todos os seus integrantes, em especial à Rafaela, Wanderleia, Marianne e Humberlânia.

Aos órgãos de fomento CNPq, CAPES e FUNCAP pelo suporte financeiro concedido a este projeto, tanto na disponibilidade de bolsa, como na aquisição de materiais.

“Nada é insuperável para quem sabe lutar e, sobretudo, para quem nunca se esquece da sua origem divina.”

J. S. Nobre

## RESUMO

A maioria dos micro-organismos encontra-se integrados em comunidades denominadas “biofilme”. Dentre estes se destaca a *Pseudomonas aeruginosa*, um patógeno oportunista de vegetais, animais e humanos, frequentemente associado à infecções nosocomiais difíceis de serem erradicadas devido à presença de biofilme. Os antibióticos fluoroquinolonas, tais como a ciprofloxacina (CIP), são utilizados contra esta bactéria, entretanto, mecanismos de resistência vem sendo desenvolvidos por este micro-organismo. Assim, novas formas de controle microbiano têm sido alvo de inúmeras pesquisas a fim de substituir ou potencializar os métodos convencionais. Para esse fim, peptídeos antimicrobianos (AMPs) obtidos de diversos seres vivos representam uma alternativa para o desenvolvimento de novas drogas. Formas sintéticas análogas ao AMP Hilina a1 (Hy-a1), isolado da espécie *Hypsiboas albopunctatus*, tem demonstrado excelente eficácia antimicrobiana, dentre os quais se destacam o peptídeo Lys-[Trp<sup>6</sup>]hy-a1 (Lys-a1). Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi verificar a influência do peptídeo Lys-a1 na atividade antimicrobiana de CIP contra o micro-organismo patogênico *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027. A concentração inibitória mínima (CIM), a concentração bactericida mínima (CBM) e a curva de morte foram determinadas para a CIP e a Lys-a1, separadamente. A influência da Lys-a1 na atividade antimicrobiana da CIP foi verificada pela metodologia *checkerboard* com quantificação da biomassa e do número de células viáveis do biofilme através da coloração pelo cristal violeta e contagem de unidades formadoras de colônia (UFC), respectivamente. Os valores de CIM e CBM da Lys-a1 foi de 125  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , e para a CIP foi de 0,24 e 0,48  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , respectivamente. Os dados mostraram que tanto a CIP quanto a Lys-a1 são potentes antimicrobianos contra *P. aeruginosa*, sendo capazes de inibir tanto o crescimento planctônico como o desenvolvimento do biofilme. A interação das substâncias foi interpretada pelo índice de concentração inibitória fracional (ICIF) e mostrou um efeito aditivo, estabelecendo uma diminuição de 16 vezes da CIM e da CBM da CIP, quando combinada com a Lys-a1. Esta influência foi observada também na cinética de morte e na atividade antibiofilme. Em conclusão, o efeito aditivo entre a Lys-a1 e a CIP na atividade antimicrobiana sugere que o peptídeo tem potencial como um agente terapêutico e adjuvante para o tratamento de doenças infecciosas causadas por *P. aeruginosa*, podendo habilitar o uso de concentrações menores do antibiótico.

**Palavras-chave:** Biofilme. *Pseudomonas aeruginosa*. Ciprofloxacina. Peptídeo antimicrobiano.

## ABSTRACT

Most microorganism lies embedded in communities called "biofilms". Among these stand out *Pseudomonas aeruginosa*, an opportunistic pathogen of plants, animals and humans, frequently associated with nosocomial infections difficult to be eradicated due to the presence of biofilm. The fluoroquinolone antibiotics such as ciprofloxacin (CIP) against this bacterium are used, however, the mechanism of resistance has been developed for this microorganism. Thus, new forms of microbial control have been the subject of numerous studies in order to replace or enhance conventional methods. For this purpose, antimicrobial peptides (AMPs) obtained from various living beings represent an alternative to the development of new drugs. Synthetic forms analogous to Hylin a1 AMP (Hy-a1), isolated from species *Hypsiboas albopunctatus*, has shown excellent antimicrobial efficacy, among which stand out the peptide Lys-[Trp<sup>6</sup>]hy-a1 (Lys-a1). Thus, the aim of this work was to verify the influence of the peptide Lys-a1 in antimicrobial activity of CIP against pathogenic microorganism *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027. Minimum inhibitory concentration (MIC), minimum bactericidal concentration (MBC) and the curve death were determined to CIP and Lys-a1 separately. The influence of Lys-a1 in the antimicrobial activity of the CIP has been verified by the *checkerboard* method to quantify the biomass and the number of viable cells in biofilms by crystal violet staining and counting of colony forming units (CFU), respectively. The MIC and MBC values of Lys-a1 was 125  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  and the CIP was 0.24 and 0.48  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , respectively. The data showed that both the CIP as Lys-a1 are potent antibiotics against *P. aeruginosa* is able to inhibit both the planktonic growth and biofilm development. The interaction of substances interpreted by the fractional inhibitory concentration index (FICI) and showed an additive effect, establishing a decrease of 16 times the MIC and MBC of the CIP, when combined with the Lys-a1. This effect was also observed in the kinetics of death and antibiofilm activity. In conclusion, the additive effect of the Lys-a1 and CIP in antimicrobial activity suggests that the peptide has potential as a therapeutic agent and an adjuvant for the treatment of infectious diseases caused by *P. aeruginosa* can enable the use of lower concentrations of the antibiotic.

**Keywords:** Biofilm. *Pseudomonas aeruginosa*. Ciprofloxacin. Antimicrobial peptide.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 –	Modelo de desenvolvimento de um biofilme. Inicialmente ocorre o transporte das bactérias a uma superfície, de forma passiva, no caso de bactérias que não apresentam motilidade (amarelo) e ativa em bactérias com motilidade (vermelho). A aderência é mediada por interações específica entre proteínas bacteriana e proteínas da superfície ou por interações hidrofóbicas com uma superfície abiótica. Os passos seguintes são a proliferação e incorporação de uma matriz extracelular, culminando na maturação e dispersão do biofilme.....	23
Figura 2 –	Ilustração da estrutura molecular da CIP mostrando a presença de uma piperazina no carbono 7, um átomo de flúor no carbono 6 e um radical no carbono 1 do núcleo aromático.....	35
Quadro 1 –	Prescrição para o uso da CIP.....	35
Figura 3 –	Representação esquemática da parede celular das bactérias Gram-negativas.....	37
Figura 4 –	Modelo de desenvolvimento do biofilme de <i>P. aeruginosa</i> . Flagelos (azul) e pili tipo IV (preto) estão envolvidos na adesão e na formação de microcolônias. QS atua como um sinal para a formação de estruturas diferenciadas conduzindo para a maturação e desprendimento do biofilme.....	39
Figura 5 –	Distribuição das publicações de acordo com a origem do AMP estudado...	42
Figura 6 –	Representação do mecanismo de interação entre os AMPs e a membrana celular: (A) modelo de tapete; (B) modelo de poro-toroidal; (C) modelo de barril.....	45
Figura 7 –	Modos de ação intracelular para atividade antimicrobiana dos AMPs.....	46
Figura 8 –	Representação esquemática das condições de cultivo da <i>P. aeruginosa</i> ATCC 9027 e do procedimento de ajuste da concentração do inóculo bacteriano para a realização dos ensaios biológicos.....	50
Figura 9 –	Representação esquemática da metodologia utilizada para determinar a CIM e CBM da Lys-a1 e da CIP contra <i>P. aeruginosa</i> ATCC 9027, segundo o teste de microdiluição padronizado pelo CLSI.....	52
Figura 10 –	Representação esquemática da metodologia utilizada para determinar a	

	CIM e CBM da CIP combinada com a Lys-a1 contra <i>P. aeruginosa</i> ATCC 9027, segundo a técnica de <i>Checkerboard</i> .....	53
Figura 11 –	Representação esquemática da metodologia utilizada para determinar a curva de tempo de morte de <i>P. aeruginosa</i> ATCC 9027 após contato com a CIP e a Lys-a1 por diferentes intervalos de tempo.....	54
Figura 12 –	Representação esquemática da metodologia de quantificação do biofilme de <i>P. aeruginosa</i> ATCC 9027, gerado em contato com a CIP e a Lys-a1 em placas de poliestireno de 96 poços de fundo chato.....	55
Figura 13 –	Representação esquemática da metodologia de quantificação das UFCs do biofilme de <i>P. aeruginosa</i> ATCC 9027 tratado com CIP sozinha e combinada com a Lys-a1.....	57
Figura 14 –	Atividade antibacteriana da CIP combinada com a Lys-a1 sobre o crescimento planctônico de <i>P. aeruginosa</i> ATCC 9027. Controle negativo (■), substâncias testes (□). * $p < 0,01$ .....	62
Figura 15 –	Curva de tempo de morte de <i>P. aeruginosa</i> ATCC 9027 após contato com a CIP e a Lys-a1 por diferentes intervalos de tempo. Controle negativo (●), CIP sozinha a $0,48 \mu\text{g.mL}^{-1}$ (■) e CIP a $0,03 \mu\text{g.mL}^{-1}$ em combinação com a Lys-a1 a $62,5 \mu\text{g.mL}^{-1}$ (▲).....	64
Figura 16 –	Avaliação da atividade antibacteriana da CIP (A) e da Lys-a1 (B) em diferentes concentrações sobre o desenvolvimento do biofilme de <i>P. aeruginosa</i> . Controle negativo (■), substância teste (□). * $p < 0,01$ .....	65
Figura 17 –	Avaliação da atividade antibacteriana da CIP em combinação com a Lys-a1 sobre o desenvolvimento do biofilme de <i>P. aeruginosa</i> ATCC 9027. Controle negativo (■), substâncias testes (□). * $p < 0,01$ .....	67
Figura 18 –	Aatividade antibacteriana da CIP em diferentes concentrações, sozinha e combinada com a Lys-a1, sobre o biofilme pré-formado de <i>P. aeruginosa</i> ATCC 9027. CIP sozinha (●) e CIP + Lys-a1 a $62,5 \mu\text{g.mL}^{-1}$ (■).....	69
Figura 19 –	Atividade antibacteriana da CIP em diferentes concentrações, sozinha e combinada com a Lys-a1, na viabilidade celular do biofilme pré-formado de <i>P. aeruginosa</i> ATCC 9027. CIP sozinha (●) e CIP + Lys-a1 a $62,5 \mu\text{g.mL}^{-1}$ (■).....	70

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – CIM e CBM da CIP e da Lys-a1 sobre a cepa <i>P. aeruginosa</i> ATCC 9027....	60
Tabela 2 – Valores e interpretação do ICIF da CIP combinada com a Lys-a1 contra <i>P. aeruginosa</i> ATCC 9027.....	61

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADP	Adenosina Difosfato
AHLs	Acil homoserina lactonas
AMP	Peptídeo Antimicrobiano
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
BHI	Brain Heart Infusion
CBM	Concentração Bactericida Mínima
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CIP	Ciprofloxacina
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
CMEB	Concentração Mínima para a Erradicação de Biofilme
CPB	Concentração de Prevenção de Biofilme
CV	Cristal Violeta
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DO	Densidade Óptica
EPS	Extracellular Polymeric Substances
<i>et al</i>	Colaboradores
EUA	Estados Unidos da América
FC	Fibrose Cística
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
HSL	Homoserina lactona
Hy-a1	Hilina a1
IACS	Infecções Associadas aos Cuidados de Saúde
ICIF	Índice de Concentração Inibitória Fracional
IN	Infecção Nosocomial
Leu	Leucina
LPS	Lipopolissacarídeo
Lys	Lisina
Lys-a1	Lys-[Trp <sup>6</sup> ]hy-a1
M	Concentração molar
mg	Miligrama
mL	Mililitro

MSCRAMMs	Microbial Surface Component Recognizing Adhesive Matrix Molecules
nm	Nanômetro
PA	Para Análise
pH	Potencial Hidrogeniônico
QS	Quorum Sensing
RP-HPLC	<i>Reversed phase - High Performance Liquid Chromatography</i>
TLR	Toll-like receptors
Trp	Triptofano
UFC	Unidade Formadora de Colônia
UNESP	Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho
UTI	Unidade de Tratamento Intensivo

## LISTA DE SÍMBOLOS

%	Porcentagem
$\alpha$	Alfa
$\beta$	Beta
C	Carbono (elemento químico)
$\mu\text{g}$	Micrograma
$\mu\text{L}$	Microlitro
$^{\circ}\text{C}$	Grau Celsius
h	hora
g	Gravidade
<	menor que
>	maior que
$\leq$	menor ou igual
NaCl	Cloreto de sódio
C <sub>4</sub> -HSL	N-butil-homoserina lactona
3O-C <sub>12</sub> -HSL	N-3-oxo-dodecanol homoserina lactona

## SUMÁRIO

### CAPÍTULO 1 – INTRODUÇÃO

1	INTRODUÇÃO.....	18
---	-----------------	----

### CAPÍTULO 2 – REVISÃO DE LITERATURA – BIOFILMES

2	BIOFILMES.....	21
2.1	Aspectos gerais.....	21
2.2	Processo de formação dos biofilmes.....	22
2.3	Metabolismo do biofilme.....	23
2.4	Matriz extracelular polimérica.....	24
2.5	Comunicação celular em biofilmes.....	25
2.6	Aspectos genéticos dos biofilmes.....	26

### CAPÍTULO 3 – REVISÃO DE LITERATURA – *Pseudomonas aeruginosa*

3	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	29
3.1	Características gerais.....	29
3.2	Fatores de virulência.....	29
3.2.1	Adesinas.....	30
3.2.2	Cápsula polissacarídica (alginato).....	30
3.2.3	Lipopolissacarídeo - LPS.....	31
3.2.4	Exoprodutos.....	31
3.3	Epidemiologia.....	32
3.4	Fluoroquinolonas.....	34
3.4.1	Ciprofloxacina.....	34
3.5	Resistência de <i>P. aeruginosa</i> aos agentes antimicrobianos.....	36
3.6	Biofilme de <i>P. aeruginosa</i> .....	38

### CAPÍTULO 4 – REVISÃO DE LITERATURA – PEPTÍDEOS ANTIMICROBIANOS

4	PEPTÍDEOS ANTIMICROBIANOS.....	41
4.1	Aspectos gerais.....	41
4.2	Peptídeo Hilina a1.....	42
4.3	Peptídeos sintéticos.....	43
4.4	Mecanismo de ação.....	44

### CAPÍTULO 5 – OBJETIVOS

5	OBJETIVOS.....	48
---	----------------	----

5.1	Objetivo geral.....	48
5.2	Objetivos específicos.....	48
<b>CAPÍTULO 6 – MATERIAIS E MÉTODOS</b>		
6	MATERIAIS E MÉTODOS.....	50
6.1	Cepa bacteriana e condições de cultivo.....	50
6.2	Síntese, purificação e preparação da solução do peptídeo Lys-a1.....	51
6.3	Preparação da solução do antibiótico ciprofloxacina.....	51
6.4	Ensaio de atividade antimicrobiana.....	51
6.5	Ensaio de <i>checkerboard</i> .....	52
6.6	Curva do tempo de morte.....	54
6.7	Ensaio de atividade antibiofilme.....	55
6.7.1	<i>Quantificação da biomassa</i> .....	55
6.8	Ensaio de <i>checkerboard</i> na formação do biofilme.....	56
6.9	Ensaio de susceptibilidade do biofilme pré-formado.....	56
6.9.1	<i>Contagem das UFC's</i> .....	56
6.10	Análise estatística.....	57
<b>CAPÍTULO 7 – RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>		
7	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	59
7.1	Determinação da CIM e da CBM.....	59
7.2	Determinação do ICIF.....	61
7.3	Curva de tempo de morte.....	63
7.4	Atividade antibiofilme.....	65
7.4.1	<i>Quantificação da biomassa</i> .....	65
7.5	Susceptibilidade do biofilme pré-formado.....	67
7.5.1	<i>Quantificação da biomassa</i> .....	68
7.5.2	<i>Contagem das Unidades Formadoras de Colônias (UFCs)</i> .....	69
8	CONCLUSÃO.....	72
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....		74

## *Capítulo 1 – Introdução*

---

## 1 INTRODUÇÃO

O estudo de diversos ecossistemas tem mostrado que a grande maioria dos micro-organismos existe na natureza associados a uma superfície formando comunidades. Estas constituem um sistema incluído em uma matriz formada por material extracelular derivado das próprias células e do ambiente chamado de “biofilme” (MARSH e MARTIN, 2005).

Os biofilmes estão relacionados a diversas atividades humanas gerando alguns benefícios, como a biodegradação de poluentes ambientais, no entanto, ocasionam prejuízos ao homem por serem responsáveis por danos nas indústrias de alimentos, pela biocorrosão de equipamentos e, sobretudo por contribuíram para o estabelecimento de doenças infecciosas e dificultarem o tratamento das mesmas pela tolerância que apresenta aos antibióticos comumente utilizados (LI *et al.*, 2012a; SREY; JAHID; HA, 2013; MEEESTERS; VAN GROENESTIJN; GERRITSE, 2003; CHEN; WEN, 2011; SUN *et al.*, 2013).

A *Pseudomonas aeruginosa* é um patógeno oportunista relacionado, principalmente, às infecções nosocomiais (KERR; SNELLING, 2009). Uma vez adquiridas, infecções por *P. aeruginosa* são difíceis de serem erradicadas devido aos seus mecanismos de resistência e pela expressão dos fatores de virulência característicos deste micro-organismo (BREIDENSTEIN; DE LA FUENTE-NÚÑEZ; HANCOCK, 2011). Esta bactéria vem adquirindo cada vez mais importância nas últimas décadas para as instituições públicas de saúde, pois é responsável por muitos casos de infecções crônicas e recorrentes, sobretudo pela presença de biofilme, que confere proteção à atuação de antibióticos devido à barreira física formada pela matriz extracelular e pelos mecanismos genéticos de resistência que são adquiridos pelos micro-organismos neste sistema (BREIDENSTEIN; DE LA FUENTE-NÚÑEZ; HANCOCK, 2011; DE LA FUENTE-NÚÑEZ *et al.*, 2013 ).

Os antibióticos fluoroquinolonas, tais como a ciprofloxacina, apresentam largo espectro de ação contra diversos patógenos, incluindo bactérias Gram-negativas como a *P. aeruginosa* que, geralmente, são mais resistentes aos antibióticos. Entretanto, cepas multirresistentes deste patógeno vêm sendo isoladas de diversos tipos de amostras clínicas. Assim, novas formas de controle microbiano têm sido alvo de inúmeras pesquisas a fim de substituir ou potencializar os métodos convencionais (RANG *et al.*, 2007; WANG; LEE; PENG, 2014; LEE *et al.*, 2010; DE LA FUENTE-NÚÑEZ *et al.*, 2013).

Neste contexto, a busca por novos compostos antimicrobianos tem sido foco de pesquisas no campo da Microbiologia. Os peptídeos antimicrobianos são um grupo heterogêneo de moléculas encontradas em diversos organismos, tais como anfíbios e

mamíferos, apresentando ampla atividade antibacteriana e antifúngica, constituindo assim uma alternativa para a indústria farmacêutica (LI *et al.*, 2012b). Formas sintéticas análogas aos peptídeos naturais têm sido desenvolvidas com o objetivo de desenvolver compostos eficientes para o controle microbiológico que sejam, ao mesmo tempo, desprovidos de efeitos citotóxicos contra células humanas (LIU *et al.*, 2011; TORCATO *et al.*, 2013).

O peptídeo sintético Lys-[Trp<sup>6</sup>]hy-a1, derivado do peptídeo antimicrobiano Hilina a1, foi sintetizado com algumas modificações estruturais em relação ao peptídeo original. Estas modificações ocorreram no N-terminal da molécula, onde foi acrescentada uma lisina, e também pela substituição de uma leucina por um triptofano na posição 6. Tais mudanças resultaram em um peptídeo com um acréscimo na sua carga positiva e, provavelmente, por consequência disso vêm se mostrando como um excelente agente antimicrobiano contra bactérias e fungos (CRUSCA *et al.*, 2011; SILVA, *et al.*, 2013)

Dentre as inúmeras possibilidades de uso dos peptídeos sintéticos, o estudo sobre sua utilização como adjuvante de antibióticos vem gerando inúmeras publicações e representa uma alternativa para a superação dos mecanismos de resistência que vem sendo apresentada pelos micro-organismos (CHOI; LEE, 2012).

*Capítulo 2 – Revisão de literatura*

*Biofilmes*

---

## 2 BIOFILMES

### 2.1 Aspectos gerais

O termo biofilme é usado para descrever comunidades de micro-organismos aderidas a uma superfície. Estes organismos são organizados em uma matriz tridimensional formada por material extracelular derivado das próprias células e do ambiente (MARSH e MARTIN, 2005). Estes são compostos geralmente por diferentes espécies que estabelecem relações de sinergismo e mutualismo, gerando benefícios cooperativos para o favorecimento do crescimento da comunidade (RICKARD *et al.*, 2006; OKUDA *et al.*, 2012).

A formação de biofilme é favorecida pela presença de uma área rica em nutrientes onde as bactérias se aderem em busca de um melhor habitat. Neste processo são adquiridas propriedades que determinam o sucesso da instalação dos micro-organismos, dentre as quais se destacam a presença da matriz exopolissacarídica, que garante uma série de benefícios contra condições adversas do ambiente, tais como estresse osmótico e presença de antibiótico e contra a fagocitose por células do sistema imune (JEFFERSON, 2004).

Os micro-organismos preferem viver aderidos a uma superfície formando biofilmes, sobretudo pelas vantagens que este sistema oferece. As pesquisas realizadas nos últimos anos sobre o crescimento de micro-organismos nestas comunidades mostram a relação dos biofilmes em várias atividades humanas, especialmente no que diz respeito à saúde pública (SUN *et al.*, 2013). Além disso, embora estejam envolvidos em muitos processos benéficos, como a biodegradação de poluentes ambientais, os biofilmes ocasionam prejuízos materiais provenientes da biocorrosão de equipamentos (SREY; JAHID; HA, 2013; LI *et al.*, 2012a; MEESTERS; VAN GROENESTIJN; GERRITSE, 2003).

A formação de biofilme por patógenos microbianos é um fator clinicamente relevante por gerar infecções que tendem a ser crônicas e recorrentes, devido à resistência à ação do sistema de defesa do hospedeiro e a tolerância aos agentes antimicrobianos convencionais. Um exemplo clássico da relação dos biofilmes em infecções crônicas é a presença de *P. aeruginosa* em pacientes acometidos por fibrose cística. Devido à importância dos biofilmes para a saúde humana, pesquisas nesta área estão constantemente sendo realizadas na tentativa de desenvolver estratégias terapêuticas eficientes para a erradicação dos biofilmes microbianos (SUN *et al.*, 2013).

## 2.2 Processo de formação dos biofilmes

De acordo com Joo e Otto (2012), a formação de um biofilme ocorre basicamente em três etapas (Figura 1). Inicialmente ocorre a ligação da célula a uma superfície e formação de microcolônias, em seguida ocorre a proliferação celular culminando na maturação do biofilme. Na última etapa acontece o destacamento ou dispersão, onde células são recrutadas para ambientes próximos, podendo determinar o surgimento de novos biofilmes.

A etapa inicial da formação do biofilme ocorre pela interação com uma superfície condicionante, também chamada de filme condicionante ou película adquirida, que irá proporcionar condições para a instalação do biofilme. O deslocamento dos micro-organismos até a superfície ocorre através de mecanismos passivos, no caso de bactérias que não possuem apêndices celulares relacionados à motilidade, e mecanismos ativos, em bactérias que apresentam estruturas para a motilidade, como o flagelo e o pili (Figura 1) (JOO; OTTO, 2012; PETROVA; SAUER, 2012).

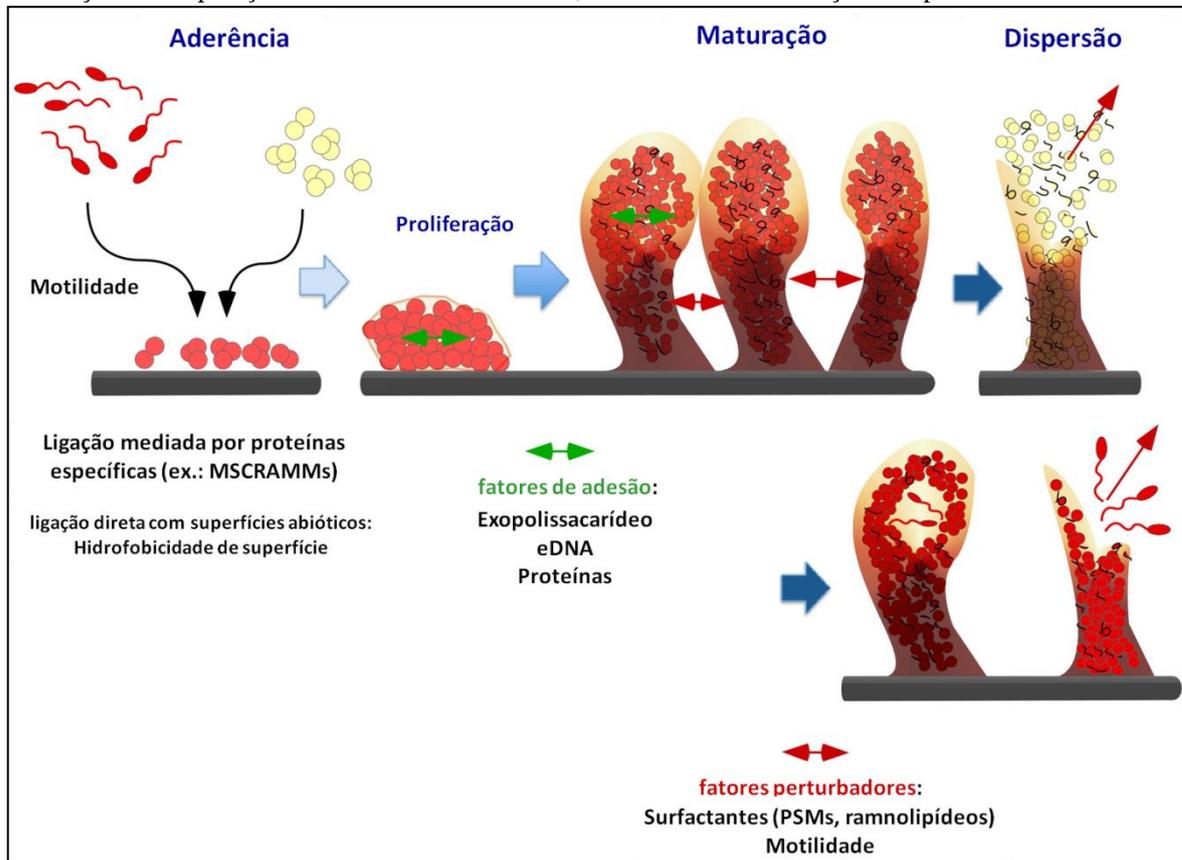
A ancoragem das bactérias a superfície ocorre através de interações eletrostáticas e hidrofóbicas, que podem ser reversíveis ou irreversíveis. Esta interação acontece entre moléculas específicas da película condicionante e as adesinas celulares, como o flagelo, o pili e o glicocálice. Com relação aos biofilmes no corpo humano, as bactérias asseguram a aderência por meio de ligações entre proteínas da superfície bacteriana com algumas proteínas presentes nos tecidos, tais como a fibronectina, o fibrinogênio, a vitronectina e a elastina, que são referidas como MSCRAMMs (*microbial surface component recognizing adhesive matrix molecules*) (JEFFERSON, 2004; DUNNE, 2002; JOO; OTTO, 2012).

As células que se ligam de forma irreversível consolidam o processo de adesão dando início à proliferação celular e a produção de substâncias extracelulares poliméricas do inglês “*extracellular polymeric substances*” (EPS), que irá proporcionar a coadesão de colonizadores secundários, formando aglomerados de bactérias e permitindo a formação de um biofilme de várias camadas (Figura 1). Além disso, a EPS fornece proteção contra antibióticos e as defesas do hospedeiro que poderiam interferir no desenvolvimento do biofilme, podendo também representar um mecanismo de armazenamento de glicose (RICKARD *et al.*, 2003; JOO; OTTO, 2012; JEFFERSON, 2004).

Os biofilmes maduros contêm canais que são essenciais para fornecer nutrientes para as células em camadas mais profundas, proporcionando um ambiente favorável para a sobrevivência das bactérias. Quando a densidade populacional alcança um nível limiar, são produzidos estímulos para a dispersão do biofilme. Tais estímulos são provenientes de

alterações na disponibilidade de nutrientes e oxigênio, e pela presença de produtos tóxicos. Nesta etapa, nas camadas mais externas começam a surgir organismos planctônicos que escapam do biofilme e colonizam outras superfícies, enquanto que as células mais próximas da superfície diminuem a atividade metabólica ou morrem (Figura 1). Estudos têm indicado que biossurfactantes facilitam a dispersão das células do biofilme e que este processo pode ser condicionado pela expressão de genes dependentes da densidade populacional, os quais são regulados por moléculas sinalizadoras do sistema de *Quorum Sensing* (QS) (JOO; OTTO, 2012; DUNNE, 2002; PAMP; TOLKER-NIELSEN, 2007; ABEE *et al.*, 2011).

Figura 1 – Modelo de desenvolvimento de um biofilme. Inicialmente ocorre o transporte das bactérias a uma superfície, de forma passiva, no caso de bactérias que não apresentam motilidade (amarelo) e ativa em bactérias com motilidade (vermelho). A aderência é mediada por interações específicas entre proteínas bacteriana e proteínas da superfície ou por interações hidrofóbicas com uma superfície abiótica. Os passos seguintes são a proliferação e incorporação de uma matriz extracelular, culminando na maturação e dispersão do biofilme.



Fonte: modificado de JOO; OTTO, 2012.

## 2.3 Metabolismo do biofilme

Para uma completa maturação dos biofilmes os substratos metabólicos necessários para o seu desenvolvimento precisam estar disponíveis no ambiente, caso contrário, os micro-organismos desagregam-se e passam a viver em estado planctônico (CERCA; JEFFERSON,

2012). Os biofilmes possuem diferentes perfis de concentração de substâncias. Isso resulta em diferentes ambientes de crescimento que pode vir a conduzir a diversidade metabólica e a distribuição espacial das espécies, além de influenciar na estruturação do biofilme. Desta forma, as características do metabolismo das bactérias dentro de um biofilme são distintas das características apresentadas na forma planctônica (MCLEAN *et al.*, 2008).

As limitações de difusão de substâncias na estrutura do biofilme resultam em variações na disponibilidade de nutrientes e oxigênio, bem como em alterações no pH. Portanto, as bactérias presentes nos biofilmes são inevitavelmente heterogêneas em relação à atividade metabólica (DAVEY; O'TOOLE, 2000; BABAUTA *et al.*, 2012; KOLEY *et al.*, 2011). Por outro lado, os canais intercalados ao longo do biofilme nas áreas circundantes das microcolônias proporcionam interações metabólicas e constituem um meio eficaz de troca de nutrientes (DAVEY; O'TOOLE, 2000).

A capacidade de sobreviver em baixas concentrações de nutrientes constitui uma das mais importantes estratégias de sobrevivência no biofilme. Nestas condições as bactérias interrompem o metabolismo de uma forma regulada que maximiza as chances de sobrevivência por um período de tempo mais longo. Eventualmente, também ocorre a paralisação dos alvos dos antibióticos, tornando-as mais resistentes (NGUYEN *et al.*, 2011).

A estruturação do biofilme também está relacionada com as variações na concentração de nutrientes disponíveis. Chávez de paz (2012) demonstrou que o desenvolvimento de um biofilme multiespécie formado por bactérias envolvidas na periodontite é afetado pela baixa atividade metabólica das células, que conseqüentemente é resultado da diminuição na concentração de glicose disponível. O efeito de diferentes condições de nutrientes na formação de biofilme também foi estudado em algumas pseudomonas, onde foi demonstrado que a dispersão do biofilme pode ser induzida pela ausência de um fluxo adequado de nutrientes ou por consequência de um aumento súbito na disponibilidade de substratos tais como o carbono (HUNT *et al.*, 2004; SAUER *et al.*, 2004; ROCHEX; LEBEAULT, 2007).

## **2.4 Matriz extracelular polimérica**

Os biofilmes são formados basicamente por células microbianas e substâncias extracelulares poliméricas produzidas pelas próprias células, que geralmente são denominadas de "exopolissacarídeos", "polissacarídeos extracelulares", "exopolímeros" ou simplesmente de EPS (LIN *et al.*, 2014).

A EPS é formada principalmente por polissacarídeos, proteínas, ácidos nucleicos e lipídios, constituindo cerca 90% da massa, em peso seco, do biofilme. Esta estrutura desempenha um papel importante na fase inicial do desenvolvimento do biofilme, uma vez que pode contribuir para a formação de uma película para a adesão das células. Além disso, as interações físico-químicas, tais como forças de Van der Waals e ligações de hidrogênio, estabelecidas entre os componentes da matriz, levam a uma estabilidade mecânica e estrutural do biofilme (FLEMMING; WINGENDER, 2010; AZEVEDO; CERCA, 2012).

A importância da presença da EPS nos estágios iniciais e tardios da formação de biofilme tem sido demonstrada pela expressão de genes envolvidos na síntese de polissacarídeo (JEFFERSON, 2004). Foi mostrado também, que a acumulação sequencial de EPS durante a formação de biofilme, forma uma complexa matriz tridimensional que conduz a uma arquitetura altamente compartimentalizada no interior do biofilme (XIAO *et al.*, 2012).

A sobrevivência do biofilme depende, sobretudo, da proteção que a EPS confere aos micro-organismos. Esta estrutura oferece proteção contra as condições adversas do ambiente, tais como a presença de células do sistema imunológico e radiação ultravioleta, além de proporcionar uma incorporação mais lenta de substâncias bactericidas. Além disso, a EPS tem importante função no metabolismo do biofilme por servir como fonte de glicose, por armazenar água e nutrientes e por conter enzimas extracelulares, permitindo que partículas advindas do ambiente e de células mortas sejam metabolizadas e utilizadas como fontes de energia (FLEMMING; WINGENDER, 2010; AZEVEDO; CERCA, 2012).

Devido à importância na formação e na sobrevivência do biofilme, a EPS tem sido alvo de pesquisas que buscam caracterizar esta estrutura e planejar estratégias para evitar a formação e maturação dessas comunidades microbianas em ambientes indesejáveis (SHENG; YU; LI, 2010; XIAO *et al.*, 2012; LIN *et al.*, 2014; WANG *et al.*, 2014).

## **2.5 Comunicação celular em biofilmes**

A comunicação entre os micro-organismos presentes no biofilme, seja este formado por uma única espécie ou por espécies distintas, é mediada por diferentes sinais químicos que são sintetizados e secretados para o ambiente. Estes sinais vão determinar a formação do biofilme e outras atividades de cooperação entre as células, contribuindo para a manutenção da biodiversidade e da homeostase deste sistema. Esta forma de comunicação é denominada de *Quorum Sensing* (QS) e está relacionada com a densidade celular no biofilme (WATERS; BASSLER, 2005; LI; TIAN, 2012).

O QS é mediado pela presença de pequenas moléculas de sinalização denominadas de autoindutores. Estes são sintetizados intracelularmente pelos micro-organismos durante o seu desenvolvimento e são continuamente libertados para o meio externo. Consequentemente, estas moléculas são acumuladas proporcionalmente ao aumento da densidade da população microbiana. Quando esta concentração atinge um determinado nível limiar, uma cascata de transdução de sinais é desencadeada gerando mudanças na expressão de genes que beneficiam a comunidade microbiana como um todo. A natureza destes sinais químicos, bem como os receptores, os mecanismos de transdução de sinais e a resposta fenotípica diferem entre as diferentes espécies bacterianas (LI; TIAN, 2012; GALLOWAY *et al.*, 2012).

O sistema QS foi originalmente descoberto em 1979, na bactéria marinha *Vibrio fischeri*, como um método envolvido no controle de produção de luz. Desde então, este sistema tem sido estudado amplamente em bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (WATERS; BASSLER, 2005; GALLOWAY *et al.*, 2012). Com relação às Gram-negativas, as moléculas de sinalização (autoindutoras) são acil homoserina lactonas (AHLs), cuja síntese é dependente de proteína LuxI. O aumento na concentração de AHLs, em resposta a densidade celular, é reconhecido pela proteína LuxR que liga-se ao um promotor específico do DNA e ativa a transcrição de um gene alvo (GALLOWAY *et al.*, 2012).

Esse sistema tem sido amplamente caracterizado em bactéria Gram-negativas tais como a *P. aeruginosa*, que apresenta um QS altamente complexo, constituído por dois circuitos interligados formados pelos sistemas *las* e *rhl*. Estes são regulados pelas homoserina lactonas (HSL) autoindutoras N-3-oxo-dodecanol homoserina lactona (3O-C<sub>12</sub>-HSL) e N-butil-homoserina lactona (C<sub>4</sub>-HSL), respectivamente (SCHUSTER *et al.*, 2003). Muitos dos fatores que contribuem para a patogenicidade do biofilme de *P. aeruginosa* são controlados por um sistema sensorial de QS que determina a produção de várias substâncias, dentre elas os ramnolipídeos. Estes, além de serem um importante fator de virulência, também são essenciais para a formação do biofilme deste patógeno (JENSEN *et al.*, 2007; PAMP; TOLKER-NIELSEN, 2007).

## 2.6 Aspectos genéticos dos biofilmes

Os micro-organismos quando associados em biofilme apresentam expressão gênica diferente da forma planctônica (WHITELEY *et al.*, 2001). Estas mudanças ocorrem por consequência da transferência horizontal de material genético entre as células no interior

do biofilme. Este ambiente também favorece a rápida propagação de fagos, bem como a conjugação e absorção de DNA plasmidial, resultando no aumento da diversidade genética (JEFFERSON, 2004). Estes processos podem trazer alguns benefícios para a sobrevivência dos micro-organismos, como a obtenção de genes que irão determinar resistência a os antibióticos (FERNÁNDEZ; BREIDENSTEIN; HANCOCK, 2011).

Além disso, a própria alteração do modo de vida bacteriano de planctônico para biofilme é um fator que afeta de forma direta a expressão gênica dos micro-organismos. Mudanças nas propriedades genéticas das células bacterianas ocorrem nas diferentes fases de formação do biofilme. Estudos indicam que na etapa de adesão das bactérias há uma expressão dos genes para a síntese do pili e do flagelo e que estes são reprimidos em etapas posteriores do desenvolvimento por não serem necessários para a manutenção do biofilme (WHITELEY *et al.*, 2001).

Em um biofilme, tipos de células especializadas, incluindo células persistentes que demonstram resistência aos antibióticos, muitas vezes surgem devido a diferenças na expressão de genes. Essa diferenciação celular em comunidades bacterianas geralmente está relacionada com o ambiente ao qual estão expostos, bem como a presença de um gradiente diferencial de nutrientes, oxigênio e elétrons, que cria microambientes para que as células respondam alterando sua expressão gênica (DE LA FUENTE-NUÑEZ *et al.*, 2013). Alterações também foram observadas na morfologia das colônias de subpopulações presentes em um mesmo biofilme. Em *Streptococcus pneumoniae*, por exemplo, foi observada a presença de colônias com características genotípicas e fenotípicas distintas para cada etapa do desenvolvimento do biofilme (ALLEGRUCCI; SAUER, 2007).

No processo de diferenciação das características genéticas no biofilme deve se considerar também a presença de organismos de espécies diferentes. Neste contexto, ocorre a expressão de genes responsáveis pela interação entre os diferentes micro-organismos, favorecendo a comunicação entre espécies distintas e determinando a formação de biofilmes multiespécies (SILVERMAN *et al.*, 2010).

*Capítulo 3 – Revisão de literatura*

*Pseudomonas aeruginosa*

---

### 3 *Pseudomonas aeruginosa*

#### 3.1 Características gerais

A espécie *Pseudomonas aeruginosa* pertence à família Pseudomonadaceae, um grupo de organismos clinicamente importantes caracterizados como bacilos Gram-negativos, aeróbios e não fermentadores. Os representantes do gênero *Pseudomonas* possuem forma de bastonetes retos ou ligeiramente curvados, apresentando motilidade por meio de um ou mais flagelos polares. Algumas cepas têm aparência mucoide e produzem pigmentos solúveis em água como, por exemplo, a piocianina que confere uma pigmentação verde-azulada característica das colônias (MURRAY *et al.*, 2004). Em condições aeróbicas, utilizam carboidratos através do metabolismo respiratório e o oxigênio como acceptor final de elétrons, podendo também crescer anaerobicamente utilizando nitrato ou arginina como acceptor alternativo de elétrons (HASSETT *et al.*, 2002).

O gênero *Pseudomonas* apresenta ampla distribuição no ambiente, com preferência por locais úmidos, sendo encontradas no solo, em matéria orgânica em decomposição, na vegetação e na água. Estes micro-organismos metabolizam uma grande variedade de substratos, exercendo função importante no ciclo do carbono na natureza, na decomposição de compostos químicos e em aplicações biotecnológicas como biorremediadores (MURRAY *et al.*, 2004; YOSHIDA *et al.*, 2009). Além disso, são utilizadas na produção de antibióticos, sideróforos, biossensores e biossurfactantes (MAVRODI *et al.*, 2006; MOSSIALOS; AMOUTZIAS, 2007; KUMAR *et al.*, 2008; REIS *et al.*, 2011).

As *Pseudomonas* estão incluídas entre os patógenos oportunistas de vegetais, animais e seres humanos. Estão frequentemente relacionadas às infecções nosocomiais, sendo a *P. aeruginosa* a mais comum e a de maior importância clínica (KERR; SNELLING, 2009).

#### 3.2 Fatores de virulência

A *P. aeruginosa* apresenta estruturas celulares e produz várias toxinas e enzimas que são caracterizadas como *fatores de virulência* por potencializarem sua patogenicidade. Estas estruturas são as adesinas, a cápsula polissacarídica e a endotoxina lipopolissacarídica. Dentre os exoprodutos (toxinas e enzimas) estão as exotoxinas A, S e T, as elastases, a protease alcalina, a fosfolipase C, os ramnolipídios e a piocianina (MURRAY *et al.*, 2004).

### 3.2.1 Adesinas

Adesinas são proteínas envolvidas na adesão das bactérias a uma superfície, proporcionando a adaptação das células para diferentes condições ambientais e agindo como um fator de virulência contra o hospedeiro. Existem duas classes principais de adesinas, as fimbriais, composta de heteropolímeros de várias subunidades, e as não fimbriais, formadas de uma única proteína ou um homotrímero (GERLACH; HENSEL, 2007).

As adesinas fimbriais ou pili, são apêndices filamentosos que se apresentam de forma mais proeminentes em bactérias Gram-negativas, onde estão ancoradas dentro da membrana externa. Estas estruturas estabelecem a adesão da bactéria através da interação com receptores presentes na superfície (GERLACH; HENSEL, 2007), além de mediar a transferência de DNA (TORTORA; FUNKE; CASE, 2012). O pili tipo IV é uma importante adesina presente em *P. aeruginosa*, sendo fundamental para a agregação de células em microcolônias e formação de biofilmes (COSTERTON; STEWART; GREENBERG, 1999), além de promover os mecanismos de motilidade da bactéria (CONRAD *et al.*, 2011) e atuar como receptores para bacteriófagos (HOLLAND; SANZ; PERHAM, 2006).

O flagelo de *P. aeruginosa* é outra adesina que, assim como o pili, confere motilidade às bactérias e está envolvida na virulência deste patógeno, contribuindo para aderência da bactéria às células epiteliais e favorecendo o estabelecimento de infecções (LILLEHOJ; KIM; KIM, 2002; FELDMAN *et al.*, 1998). Foi relatado também que a presença do flagelo, bem como a presença da proteína flagelina purificada, auxilia na resposta inflamatória (KIM *et al.*, 2014). Além disso, o flagelo atua como um mediador do primeiro contato físico da bactéria a uma superfície, estabelecendo o processo de fixação das células, favorecendo o início da formação do biofilme (PETROVA; SAUER, 2012).

Assim, a aderência parece ser a fase mais importante e crítica no estabelecimento das infecções. Além do pili e do flagelo, outras adesinas descritas como fatores de virulência em *P. aeruginosa* inclui proteínas, tais como as lectinas, que promovem a adesão da bactéria mediada pela interação com carboidratos (BLANCHARD *et al.*, 2008).

### 3.2.2 Cápsula polissacarídica (alginato)

A *P. aeruginosa* produz uma cápsula, chamada de alginato por ser constituída basicamente por este polissacarídeo. Além de conferir um aspecto mucóide em algumas cepas, o alginato contribui para a adesão da bactéria a uma superfície (MAI *et al.*, 1993) e está

presente na estrutura do biofilme como constituinte da EPS (NIVENS *et al.*, 2001; HAY *et al.*, 2009), impedindo a difusão de agentes antimicrobianos (HODGES; GORDON, 1991) e protegendo as células contra os mecanismos de defesa do hospedeiro (LEID *et al.*, 2005).

Apenas dois gêneros bacterianos são capazes de sintetizá-lo, *Pseudomonas* e *Azotobacter*, sendo a biossíntese em *P. aeruginosa* mediada por um conjunto de 12 genes (REMMINGHORST; REHM, 2006). A produção deste polímero está frequentemente associada às cepas presentes em infecções, principalmente nas infecções pulmonares em pacientes com fibrose cística, promovendo a formação de biofilme no pulmão, que dificulta o tratamento e contribui para a mortalidade destes pacientes (DORING *et al.*, 2000).

### 3.2.3 Lipopolissacarídeo - LPS

Outra estrutura importante na patogenicidade de *P. aeruginosa* é o lipopolissacarídeo (LPS), também chamado de endotoxina. Esta molécula é constituída por um lipídio A, componente hidrófobo que se localiza na membrana externa, responsável pela ação endotóxica, um núcleo polissacarídeo e um antígeno O contendo normalmente alguns monossacarídeos repetidos e alguns componentes não carboidratos (WANG; QUINN, 2010).

O antígeno O da LPS de *P. aeruginosa* é responsável por conferir especificidade aos sorogrupos (BYSTROVA *et al.*, 2006) e a região do lipídio A pela ativação da resposta imune, que é desencadeada pela ligação desta estrutura a receptores celulares conhecidos como *toll-like receptors* (TLR), encontrados na superfície de células imunitárias. Entretanto, em isolados clínicos de pacientes com fibrose cística foram reconhecidas cepas de *P. aeruginosa* capazes de modular a estrutura dos lipídios, resultado em alterações no reconhecimento imunológico inato do hospedeiro para este patógeno (ERNST *et al.*, 2003).

### 3.2.4 Exoprodutos

Além das proteínas que são parte dos apêndices celulares, *P. aeruginosa* também produz exoproteínas que desempenham um papel decisivo na difusão da bactéria e nos danos aos tecidos. Dentre estas, estão algumas toxinas e proteases que são secretadas pela célula através de complexos mecanismos de secreção descritos por Bleves e colaboradores (2010).

Dentre as toxinas de *P. aeruginosa*, a exotoxina A se destaca por ser bastante tóxica as células eucarióticas (CHIEDA *et al.*, 2011), ocasionando danos nos tecidos e imunossupressão no hospedeiro. Esta toxina, assim como as exotoxinas S e T, pertence à

classe das ADP-ribosiltransferases, que causam a ADP-ribosilação de algumas proteínas intracelulares importantes, contribuindo para os danos celulares decorrentes das infecções por *P. aeruginosa* (HORNEF *et al.*, 2000; YATES; MERRILL, 2004). Apesar da toxicidade apresentada pela exotoxina A, esta proteína também tem ação imunogênica. Estudos relatam que a imunização com esta exotoxina semipurificada estabeleceu proteção contra infecções causadas por *P. aeruginosa* (MANAFI *et al.*, 2009). Baseado nesta propriedade, a exotoxina A tem sido utilizada como adjuvante de vacinas (QIAN *et al.*, 2007).

A protease alcalina e as elastases contribuem para a patogenicidade de *P. aeruginosa* através da degradação de importantes proteínas, tais como a elastina, induzindo mudanças na estrutura da parede vascular dos vasos sanguíneos, provocando lesões nas células endoteliais e induzindo hemorragia que podem agravar o quadro clínico nas infecções por *P. aeruginosa* (KOMORI; NONOGAKI; NIKAI, 2001). Com relação às hemolisinas, fosfolipase C e ramnolipídio, produzidas por *P. aeruginosa*, podem agir sinergicamente para quebrar lipídios e lecitina, contribuindo para a propagação da bactéria e ajudando na degradação das membranas das células. A Fosfolipase C é altamente ativa na clivagem de fosfolipídios, enquanto que os ramnolipídios atuam como biossurfactante na superfície das células (LÓPEZ *et al.*, 2011; JENSEN *et al.*, 2007).

A piocianina, um pigmento produzido por *P. aeruginosa*, é outro fator de virulência que se destaca, uma vez que ocasiona diversos danos a nível celular. Estes danos são consequências do estresse oxidativo proveniente das formas tóxicas do oxigênio, que são produzidas na presença deste pigmento (MULLER, 2002).

### 3.3 Epidemiologia

A *P. aeruginosa* é uma bactérias endofíticas que, em geral, influencia sobre o crescimento das plantas hospedeiras em termos de beneficiar na fixação de nitrogênio (GUPTA; PANWAR; JHA, 2013) e atuar no controle biológico de fungos fitopatogênicos (CORDERO *et al.*, 2012). Sua presença pode trazer malefícios e ocasionar prejuízos ao homem, podendo causar doenças em plantas e animais (PEIX; RAMÍREZ-BAHENA; VELÁZQUEZ, 2009), sendo esta bactéria uma das causadoras de doenças em peixes, responsável pela ocorrência de danos econômicos na piscicultura (THOMAS, *et al.*, 2014).

A respeito de sua patogenicidade aos seres humanos, está frequentemente relacionada com infecções primárias da pele, do trato urinário e infecção pulmonar crônica em pacientes com fibrose cística (FC). Vale ressaltar que estas patologias estão

frequentemente relacionadas às infecções adquiridas no ambiente hospitalar, atualmente designadas por Infecções Nosocomiais (IN) ou Infecções Associadas aos Cuidados de Saúde (IACS) (HENRIQUE; VASCONCELOS; CERCA, 2012).

Os fatores etiológicos das IN estão no próprio ambiente hospitalar. Locais como, reservatórios de água, torneiras, pias, chuveiros, aparelhos de terapia respiratória e até mesmo medicamentos e desinfetantes são favoráveis à colonização da *P. aeruginosa*. Embora não seja considerado um componente da flora de humanos, este patógeno pode estar presente tanto em pessoas saudáveis quanto em pessoas doentes. Neste último caso, o paciente se torna o ponto alvo para o surgimento de IN, por estar com o sistema imunológico debilitado, e tornar-se um possível transmissor do patógeno (KERR; SNELLING, 2009).

As lesões na pele de pacientes com queimaduras constituem a porta de entrada para a *P. aeruginosa*. Neste ambiente, o calor, a umidade e o pH estão entre os fatores benéficos para o seu desenvolvimento e o estabelecimento de infecções (ANDONOVA; URUMOVA, 2013). Com relação às infecções do trato urinário, estas constituem cerca de 25-40% das IN e estão associadas a utilização de cateter, que fornece uma superfície ideal para a formação de biofilmes (LOURENÇO; CERCA; AZEVEDO, 2012).

A *P. aeruginosa* está presente em cerca de 80% dos pacientes adultos acometidos por FC. Por ser um patógeno versátil, esta bactéria se adapta as condições do ambiente, podendo alterar o seu fenótipo não mucoide para a forma mucoide, conduzindo a formação de biofilme. Assim, a eliminação do micro-organismo se torna mais complexa, agravando o quadro clínico e diminuindo a expectativa de vida destes pacientes, que em 2008 era de 37 anos (LOPES; AZEVEDO; PEREIRA, 2012). Vale resaltar também a prevalência desta bactéria em infecções estabelecidas nas unidades de tratamento intensivo (UTIs). Um estudo brasileiro verificou que 29% dos doentes internados estas unidades adquiriram uma infecção, sendo a *P. aeruginosa* responsável por 31% dos casos e a bactéria *Staphylococcus aureus* por 42% (HENRIQUE; VASCONCELOS; CERCA, 2012).

O impacto das IN é enorme em termos de saúde, social e econômico. Atualmente, as IN são a quarta causa de morte nos Estados Unidos da América (EUA), sendo 60% destas infecções causadas pela utilização de dispositivos médicos e implantes cirúrgicos. Além disso, surgem cerca de 2 milhões de novos casos anualmente, gerando um custo em torno de 5 bilhões de dólares por ano. É importante ressaltar que os micro-organismos descritos como causadores destas infecções são todos potenciais formadores de biofilme, dentre os quais está se destaca a bactéria *P. aeruginosa* (HENRIQUE; VASCONCELOS; CERCA, 2012).

### 3.4 Fluoroquinolonas

O surgimento do primeiro antibiótico isolado a partir do fungo *Penicillium notatum*, bem como a descoberta da sulfá no século XX, representou o início da quimioterapia que, desde então, vem possibilitando a cura de diversas patologias ocasionadas pelos microorganismos. Em relação ao mecanismo de ação destes, descreve-se a destruição da parede celular, inibição da síntese de proteínas e ácidos nucleicos, e atividade antimetabólitos (KOHANSKI; DWYER; COLLINS, 2010). Na década de 1980 foi desenvolvida uma classe de agentes antimicrobianos denominados de fluoroquinolonas, obtidas pela adição de um átomo de flúor na posição C-6 no anel aromático do ácido nalidíxico, os quais apresentam importante ação contra bactérias Gram-negativas e Gram-positivas (RANG *et al.*, 2007).

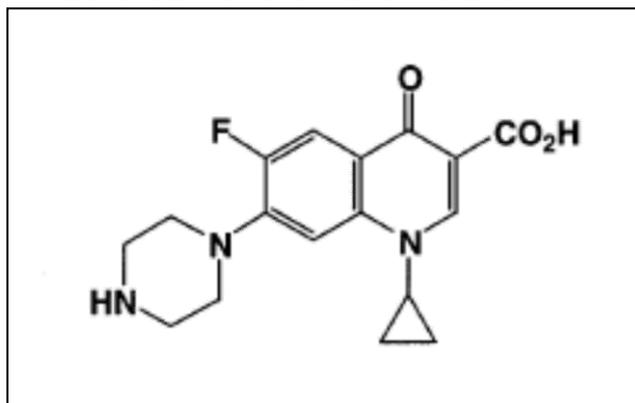
O mecanismo de ação das fluoroquinolonas está relacionado com a inibição da síntese do DNA. Este efeito é mediado através da formação de um complexo entre a droga, o DNA bacteriano e as duas enzimas DNA-girase e topoisomerase IV durante a replicação. Ambas as enzimas são topoisomerases tipo II, que atuam rompendo as duas cadeias de um segmento de DNA na divisão celular da bactéria, dessa forma elas não conseguem prosseguir com a síntese do DNA, conduzindo para a morte celular (HOOPER, 2001).

Com relação às aplicações clínicas das fluoroquinolonas, de acordo com Rang e colaboradores (2007), estes antimicrobianos são utilizados para o tratamento de infecções do trato urinário, infecções respiratórias em pacientes com fibrose cística e otites causadas por *P. aeruginosa*, em osteomielite crônica gerada por bacilos Gram-negativos, na erradicação de *Salmonella typhi*, no tratamento de gonorreia, prostatite bacteriana, cervicite e antraz. Este autor ainda ressalta que os efeitos adversos destes antimicrobianos são pouco frequentes, podendo ocasionar distúrbios gastrintestinais, erupções cutâneas e sintomas no sistema nervoso central, no entanto estes geralmente se apresentam de forma moderada.

#### 3.4.1 Ciprofloxacina (CIP)

A ciprofloxacina (CIP) é a fluoroquinolona mais comumente utilizada. Este antibiótico, cujo nome químico é ácido 1-ciclopropil-6-flúor-1,4-diidro-4-oxo-7-(1-piperazil)-3-quinolona, consiste em uma quinolona com característica anfipática a qual foi adicionada uma piperazina na posição C-7, resultando em um composto com maior atividade contra a bactéria *P. aeruginosa* (Figura 2) (CAZEDEY, 2009).

Figura 2 – Ilustração da estrutura molecular da CIP mostrando a presença de uma piperazina no carbono 7, um átomo de flúor no carbono 6 e um radical no carbono 1 do núcleo aromático.



Fonte: modificado de CAZEDEY, 2009.

A CIP apresenta ação efetiva contra vários micro-organismos, apresentando excelente atividade contra bacilos Gram-negativos entéricos e contra as pseudomonas (RANG *et al.*, 2007). Este medicamento é comercializado no Brasil por vários laboratórios e está disponível na forma farmacêutica de solução e pomada oftálmica, comprimido revestido, solução para infusão e solução injetável (CAZEDEY, 2009). Salvo prescrição médica contrária, segundo indicações encontradas na bula deste medicamento as doses de CIP (mg) recomendadas para o tratamento de infecções encontram-se indicadas no quadro 1. Quando administrada oralmente, a CIP tem uma rápida absorção, sendo este processo interferido pela presença de antiácidos (RANG *et al.*, 2007).

Quadro 1 – Prescrição para o uso da CIP.

INDICAÇÕES		Dose diária intravenosa para adulto
Infecção do trato respiratório	de acordo com a gravidade e o agente etiológico	2 x 200 a 400 mg
Infecção do trato urinário	- Aguda, não complicada	2 x 100 mg
	- Cistite em mulheres antes da menopausa	dose única 100 mg
	- Complicada	2 x 200 mg
Gonorreia	- Extragenital	2 x 100 mg
	- Aguda, não complicada	dose única 100 mg
Diarreia		2 x 200 mg
Outras infecções		2 x 200 a 400 mg
Infecções graves, com risco de vida	Pneumonia estreptocócica, infecções recorrentes em fibrose cística, infecções ósseas e das articulações, septicemia, peritonite (principalmente causadas por <i>Pseudomonas</i> , <i>Staphylococcus</i> ou <i>Streptococcus</i> )	3 x 400 mg

Fonte: CIPROFLOXACINA, 2013. Bula de remédio.

A utilização em larga escala da CIP tem gerado problemas não só a respeito da resistência adquirida por micro-organismos patológicos durante um tratamento clínico, mas também vem representando um risco importante para o meio ambiente. Resíduos deste antibiótico têm sido encontrados na água e no solo, podendo inibir o crescimento de micro-organismos do ambiente ou determinar o surgimento de resistência a antibióticos e, conseqüentemente, interferir na ecologia microbiana dos ecossistemas (GIRARDI *et al.*, 2011; MARTI *et al.*, 2014). Além disso, trabalhos mostram que a introdução deste antibiótico em um sistema aquático pode levar ao aumento da resistência microbiana, não só à CIP, mas também a outros tipos de antibióticos (HELT *et al.*, 2012).

### **3.5 Resistência de *P. aeruginosa* aos agentes antimicrobianos**

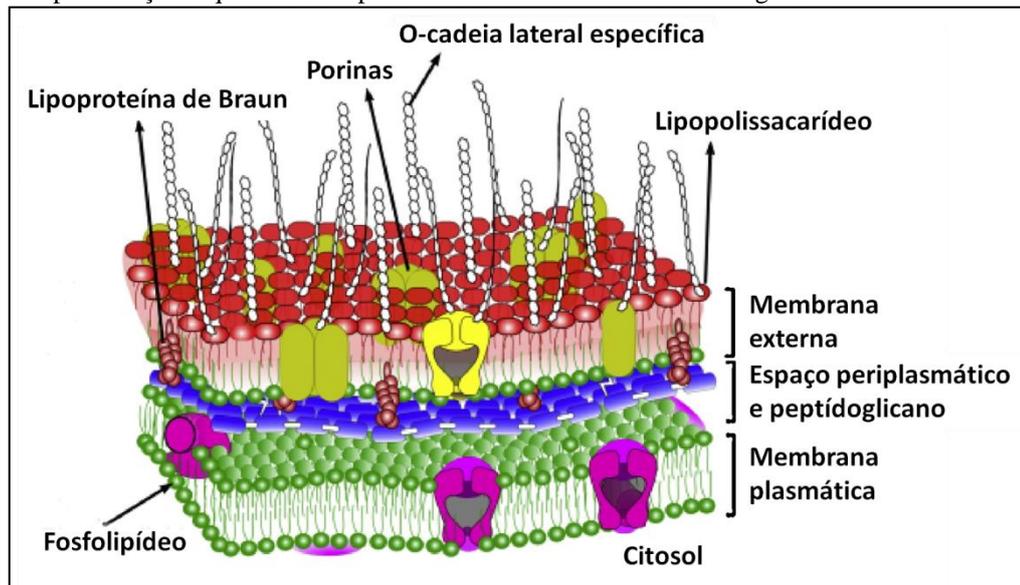
Bento e Cerca (2012) descreveram o processo de resistência antimicrobiana como a capacidade de um micro-organismo crescer na presença de uma elevada concentração de antibióticos. De acordo com Chen, Chopra e Kaye (2011), esta resistência pode ser intrínseca, quando os micro-organismos não possuem o alvo ao qual a droga se direciona ou quando dispõe de barreiras naturais que impedem a substância de atingir o seu alvo, e pode ser adquirida quando ocorrem modificações genéticas resultando na eliminação ou diminuição da suscetibilidade a atividade antimicrobiana.

A *P. aeruginosa* é intrinsecamente resistente a uma variedade de agentes antimicrobianos por apresentar mecanismos que impedem a ação destes, dentre os quais se destacam a baixa permeabilidade da membrana externa, o sistema de efluxo, a produção de enzimas inativadoras de aminoglicosídeos, produção de  $\beta$ -lactamases e alteração no alvo das fluoroquinolonas (SOARES, 2005). Além disso, a *P. aeruginosa* pode apresentar resistência adquirida pela obtenção de genes relacionados à resistência aos antibióticos ou através de mutações genéticas espontâneas induzidas pelos próprios antibióticos ou pelas condições de sobrevivência (BREIDENSTEIN; DE LA FUENTE-NÚÑEZ; HANCOCK, 2011).

A parede celular das bactérias Gram-negativas consiste em uma ou poucas camadas de peptidoglicanos e uma membrana externa formada por LPS, lipoproteínas e fosfolipídeos atuando como uma barreira hidrofóbica. Parte da permeabilidade desta membrana é devido à presença das proteínas denominadas porinas, que formam canais para a passagem de moléculas (TORTORA; FUNKE; CASE, 2012) (Figura 3). Dentre as porinas expressas por *P. aeruginosa*, a OprF é citada como a principal, sendo responsável pela difusão de vários tipos de substrato (SOARES, 2005). Já a porina OmpF é conhecido por

desempenhar um papel importante na absorção dos antibióticos fluoroquinolona (FERNANDES *et al.*, 2007). Tem sido demonstrado que a resistência aos antimicrobianos em um grande número de espécies bacterianas ocorre devido a alterações de perfis da membrana externa e através de modificações nos canais proteicos (DELCOUR, 2009).

Figura 3 - Representação esquemática da parede celular das bactérias Gram-negativas.



Fonte: modificado de TRIPATHI *et al.*, 2012.

O mecanismo de efluxo nos micro-organismos é responsável por transportar ativamente compostos tóxicos de dentro da célula para o meio externo através de canais proteicos. A *P. aeruginosa* contém genes que codificam cerca de 12 sistemas de efluxo, dos quais sete já foram caracterizados (KUMAR; SCHWEIZER, 2005). De acordo com Morita, Tomida e Kawamura (2014), as bombas de efluxo MexAB-OprM e MexXY-OprM estão relacionadas ao mecanismo de resistência intrínseca às fluoroquinolonas, enquanto que os sistemas de efluxo MexAB-OprM, MexCD-OprJ, MexEF-OprN e MexXY-OprM foram reconhecidos como determinantes de resistência a estes antibióticos em isolados clínicos.

Além disso, a *P. aeruginosa* produz enzimas modificadoras de aminoglicosídeos, tais como as nucleotidiltransferases, fosfotransferases e acetiltransferases, e  $\beta$ -lactamases que apresentam um importante papel no mecanismo de defesa contra os antibióticos aminoglicosídeos e  $\beta$ -lactâmicos (RAMIREZ; TOLMASKY, 2010; POOLE, 2005; SOARES, 2005). Com relação às fluoroquinolonas, a *P. aeruginosa* pode apresentar modificações na permeabilidade da membrana, causada por alterações nas porinas, indução do sistema de efluxo e modificações no alvo destes antibióticos através de mutações em genes que codificam as subunidades de DNA-girase e topoisomerase IV (HOOPER, 2001).

Muito se conhece sobre os mecanismos de resistência intrínseca e adquirida em *P. aeruginosa*, no entanto, Fernández, Breidenstein e Hancock (2011) ressaltam a importância da resistência adaptativa, que é induzida em resposta a presença de determinados sinais, tais como a presença de antibióticos. Em *P. aeruginosa*, um exemplo de resistência adaptativa ocorre em cepas que infectam o pulmão de pacientes com FC, pela capacidade de se aderirem ao ambiente anaeróbico característico.

A presença de cepas multirresistentes tem sido detectada em níveis alarmantes, representando um problema de saúde em todo o mundo. No Brasil, segundo dados publicados em 2011, o índice de cepas de *P. aeruginosa* resistentes ao antibiótico CIP atingiu 93,7 % dos isolados clínicos obtidos de centros hospitalares da região Sul (NEVES *et al.*, 2011). Assim, a compreensão dos mecanismos de resistência aos antibióticos desenvolvidos por este patógeno se torna necessária na busca pelo controle eficaz.

## **2.6 Biofilme de *P. aeruginosa***

A bactéria *P. aeruginosa* possui forte tendência para formar biofilmes pela sua capacidade de aderência a uma variedade de superfícies incluindo ambientes naturais, industriais, hospitalares e dispositivos médicos, tais como cateteres ou implantes que muitas vezes resultam em infecções crônicas difíceis de serem tratadas (ROCHEX; LEBEAULT, 2007; WALKER *et al.*, 2014; HAMMOND *et al.*, 2010).

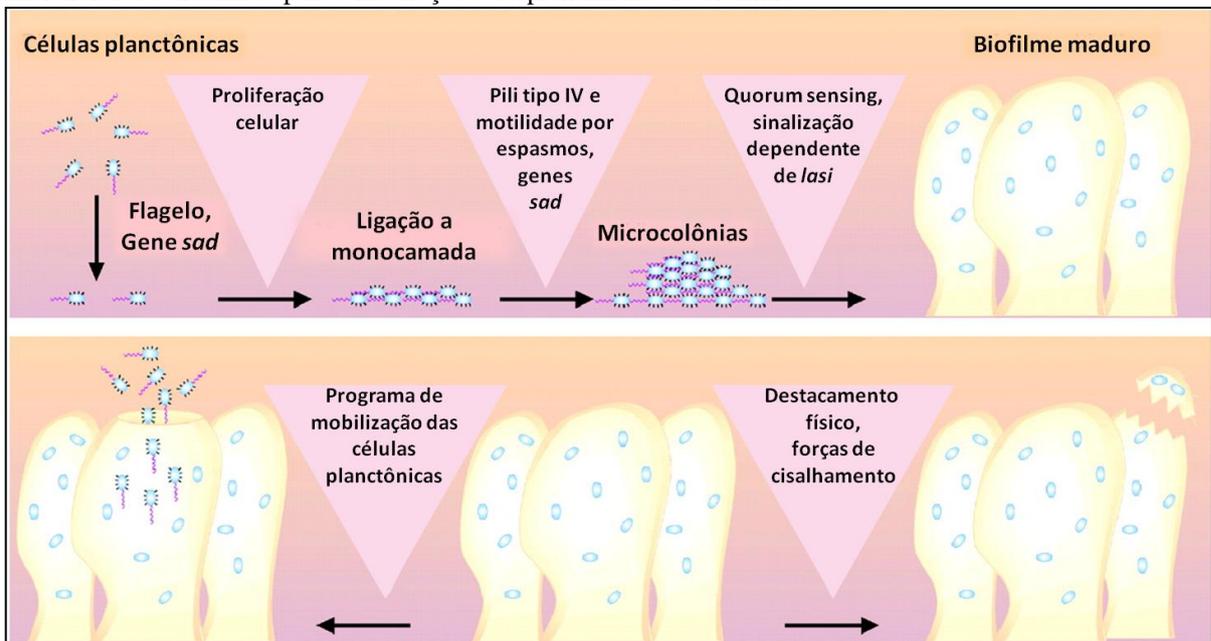
No primeiro contato com a superfície, o flagelo e o pili tipo IV interagem cooperativamente para estabelecer a ancoragem e agregação das células em microcolônias (Figura 4). Após a aderência, inicia a expressão do sistema de QS para a ativação de genes relacionados com a produção da matriz extracelular, de ramnolipídios e de alguns fatores de virulência (COSTERTON; STEWART; GREENBERG, 1999; CONRAD *et al.*, 2011; SHARMA *et al.*, 2014). Os ramnolipídios têm múltiplos papéis no desenvolvimento do biofilme de *P. aeruginosa*. Estes são necessários para a formação das microcolônias, estruturação da forma de cogumelo, manutenção de canais de água e dispersão do biofilme (PAMP; TOLKER-NIELSEN, 2007).

A matriz extracelular do biofilme de *P. aeruginosa* é composta por três exopolissacarídeos distintos, o alginato, a PEL e PSL. O alginato é produzido por cepas mucoides e desempenha importante função na manutenção das condições hídricas do biofilme (CHANG *et al.*, 2007; Li *et al.*, 2010a). Com relação aos polissacarídeos PEL e PSL, estes são importantes na arquitetura do biofilme de cepas não mucoides por atuar na adesão a

superfície e na manutenção da estrutura da matriz (RYDER; BYRD; WOZNIAK , 2007). Além dos exopolissacarídeos ocorre também a presença de proteínas e DNA extracelular que fornece integridade estrutural para o biofilme (FLEMMING; WINGENDER, 2010).

No último estágio de desenvolvimento, sinais são emitidos para que ocorra à liberação de células a partir do biofilme. Tem sido sugerido que este processo em *P. aeruginosa* envolve a ação de ramnolipídios (PAMP; TOLKER-NIELSEN, 2007) podendo ocorrer também em resposta à quantidade inadequada de nutrientes (ROCHEX; LEBEAULT, 2007) e pela ação de uma enzima que digere o alginato, gerando a fragmentação da estrutura (COSTERTON; STEWART; GREENBERG, 1999) (Figura 4).

Figura 4 - Modelo de desenvolvimento do biofilme de *P. aeruginosa*. Flagelos (azul) e pili tipo IV (preto) estão envolvidos na adesão e na formação de microcolônias. QS atua como um sinal para a formação de estruturas diferenciadas conduzindo para a maturação e desprendimento do biofilme.



Fonte: modificado de COSTERTON; STEWART; GREENBERG, 1999.

*Capítulo 4 – Revisão de literatura*

*Peptídeos antimicrobianos*

---

## 4 PEPTÍDEOS ANTIMICROBIANOS

### 4.1 Aspectos gerais

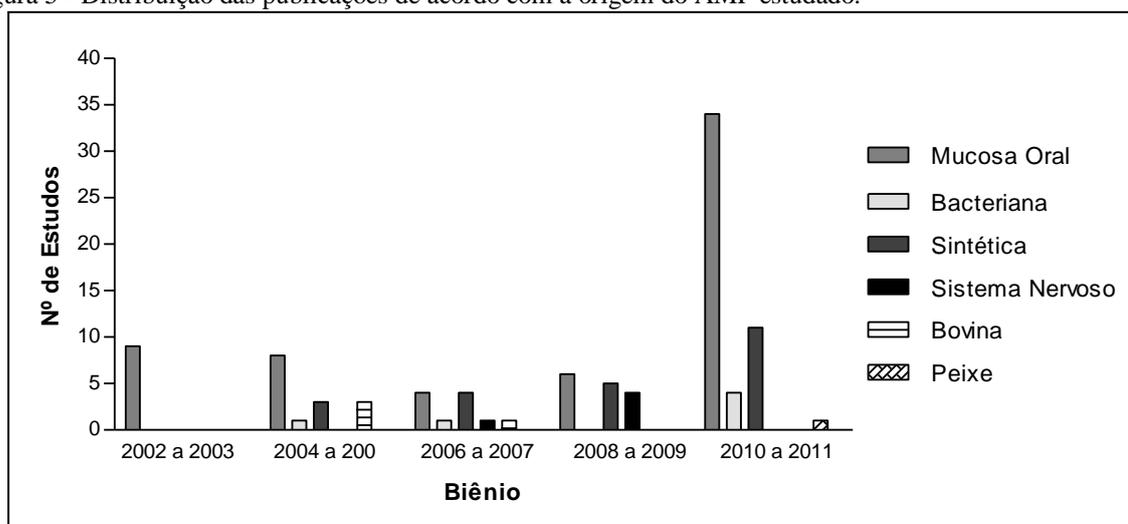
Peptídeos antimicrobianos (AMPs) são importantes moléculas envolvidas em várias funções fisiológicas dos seres vivos, incluindo a imunidade inata. Normalmente são formados por 30 a 60 aminoácidos e são catiônicos. Até o momento aproximadamente 2426 peptídeos antimicrobianos foram descritos, segundo um banco de dados disponível *on-line* (<http://aps.unmc.edu/AP/main.php>), os quais foram isolados de diversas espécies, incluindo bactérias, insetos, plantas e vertebrados (LI *et al.*, 2012b).

Os estudos sobre agentes antimicrobianos naturais iniciaram-se em meados da década de 1920, primeiramente pelo pesquisador Alexander Fleming que descobriu a atividade antimicrobiana da lisozima, o primeiro antibiótico natural isolado a partir do corpo humano. Desde então, vários compostos naturais com atividade antimicrobiana têm sido isolados, dentre os quais se destacam os AMPs, que nas últimas duas décadas vêm sendo descritos como importantes moléculas com potencial terapêutico contra micro-organismos patogênicos (NAKATSUJI; GALLO, 2012)

Os estudos sobre os AMPs como uma nova classe de agentes terapêuticos têm atraído interesse de muitos grupos de pesquisas, devido ao aumento da incidência de micro-organismos patogênicos resistentes aos antibióticos convencionais (SHARMA *et al.*, 2014). Isso tem aumentado o número de publicações sobre a atividade antimicrobiana dessas moléculas, sobretudo os estudos relacionados às mucosas orais pela direta relação dos AMPs com o sistema imunológico desse ambiente. Além desse grupo de peptídeos, tem se observado um avanço nas pesquisas com AMPs de origem sintética, sendo a classe mais estudada logo após os peptídeos da cavidade oral (SILVA *et al.*, 2012) (Figura 5).

Estes estudos têm elucidado a ação dos AMPs contra uma variedade de micro-organismos, incluindo bactérias Gram-negativas e positivas, fungos, vírus e sobre células tumorais (LI *et al.*, 2012b). No entanto, algumas limitações restringem a utilização terapêutica destas moléculas. Uma dessas limitações é que, muito embora a maioria dos AMPs catiônicos tenha alta atividade em condições não fisiológicas, na presença de fluidos biológicos como plasma, soro ou saliva, a atividade antimicrobiana é significativamente reduzida. Esta característica, associada à toxicidade de alguns AMPs e a rápida excreção renal, dificultam ou impossibilitam a utilização clínica destas moléculas (BATONI *et al.*, 2011).

Figura 5 - Distribuição das publicações de acordo com a origem do AMP estudado.



Fonte: SILVA *et al.*, 2012.

## 4.2 Peptídeos Hilina a1

O peptídeo antimicrobiano Hilina a1 (Hy-a1) foi primeiramente isolado por Castro e colaboradores (2009) a partir da secreção da pele do sapo arbóreo *Hypsiboas albopunctatus*, comumente encontrado em regiões da América do Sul e presente na biota do cerrado. No mesmo estudo, foram realizadas análises referentes à sua estrutura primária e secundária, além da avaliação do seu potencial antimicrobiano e da atividade citolítica.

A secreção da pele de *H. albopunctatus* foi obtida pelo método de estimulação elétrica e fracionada por RP-HPLC, resultando em 50 frações que foram testadas quanto à atividade antimicrobiana e também quanto à capacidade de lisar eritrócitos humanos. Uma fração citolítica foi detectada e purificada por etapas adicionais de cromatografia. Este novo peptídeo, foi chamado de hilina a1 (Hy-a1), teve sua estrutura primária determinada por Degradação de Edman automatizada e consiste em uma cadeia polipeptídica linear de 18 resíduos de aminoácidos (IFGAILPLALGALKNLIK-NH<sub>2</sub>). Análise por espectrometria de massa (MALDI-TOF) mostrou um peptídeo altamente puro com a presença de um resíduo de aminoácido  $\alpha$ -amidado na região C-terminal. O peptídeo hy-a1 foi sintetizado, manualmente, e sua estrutura secundária foi determinada por estudos de dicroísmo circular, que mostraram uma molécula com alto teor de  $\alpha$ -hélice com caráter anfipático (CASTRO *et al.*, 2009).

No que se refere a sua atividade antimicrobiana, o peptídeo Hy-a1 se mostrou efetivo contra bactérias Gram-negativas tais como a *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*. Contudo, a sua atividade se mostrou mais acentuada nas bactérias Gram-positivas *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis* e *Bacillus subtilis*, além de uma ação

significativa contra as cepas fúngicas *Candida albicans*, *C. krusei*, *C. parapsilosis* e *Cryptococcus neoformans*, fato este que evidencia seu amplo espectro de ação (CASTRO *et al.*, 2009). Em adição à atividade antimicrobiana, Hy-a1 apresentou forte atividade hemolítica contra eritrócitos humanos, fato este que pode representar um problema em termos de aplicações clínicas deste peptídeo como um antibiótico alternativo. No entanto, derivados podem ser produzidos por modificações estruturais, de modo a evitar a atividade hemolítica e aumentar a ação antimicrobiana (CASTRO *et al.*, 2009; CRUSCA *et al.*, 2011).

O potencial antimicrobiano e atividade citotóxica de peptídeos obtidos de secreções de anuros tem sido bastante explorado por diferentes grupos de pesquisas. Modificações pós-traducionais ocorrem comumente nos peptídeos antimicrobianos de anuros, dentre as quais está a amidação do C-terminal, essencial para a atividade antimicrobiana e citotoxicidade por contribuir para o aumento da carga positiva geral da molécula (SHALEV; MOR; KUSTANOVICH, 2002; CONLON *et al.*, 2014).

### 4.3 Peptídeos sintéticos

O grande interesse pelos AMPs levou à necessidade de estudos químicos, físicos, farmacológicos e bioquímicos sobre estas moléculas. No entanto, estes são obtidos das fontes biológicas em quantidades insuficientes para o desenvolvimento de tais pesquisas. Assim, a síntese dessas moléculas possibilitou importantes estudos sobre as características estruturais e o mecanismo de ação (CASTRO *et al.*, 2009; WIRADHARMA *et al.*, 2011).

Além disso, embora os AMPs de origem nativa tenham se mostrado com ação antimicrobiana eficiente em relação às diversas drogas comerciais, análogos sintéticos, derivados de modificações pontuais, foram desenvolvidos com a finalidade de ampliar o arsenal de AMPs viáveis para utilização tanto em ensaios *in situ* como *in vivo*. Em geral são obtidos por modificação e/ou otimização das sequências do peptídeo nativo com o objetivo de melhorar seus efeitos antimicrobianos, enquanto, em paralelo, procura-se reduzir o efeito citotóxico contra células humanas (WIRADHARMA *et al.*, 2011; TORCATO *et al.*, 2013; LEE *et al.*, 2013; CRUSCA *et al.*, 2011).

Dentre as diversas fontes de AMPs, as glândulas de anuros têm sido bem estudadas por representar uma das mais ricas reservas destes antimicrobianos (CONLON *et al.*, 2014). Contudo, tendo em vista que a atividade biológica e a citotoxicidade dos AMPs está frequentemente associada com o número de cargas positivas e a sua estrutura, Crusca Jr e colaboradores (2011) avaliaram a importância da carga e da região N-terminal deste peptídeo

na atividade biológica. Para isso, quatro análogos do peptídeo Hy-a1, com o triptofano (Trp) substituindo a leucina (Leu) na posição 6 e com modificações na extremidade N-terminal, foram manualmente sintetizados por meio da técnica de síntese de peptídeo em fase sólida.

Dentre os peptídeos sintetizados, destaca-se o peptídeo Lys-[Trp<sup>6</sup>]hy-a1 (Lys-a1) devido a sua marcante atividade antimicrobiana. Para a obtenção deste, além da substituição da Leu pelo Trp na posição 6, foi adicionada uma lisina (Lys) no N-terminal do peptídeo original (Hy-a1), conferindo uma carga positiva nessa extremidade. Devido ao Trp ser considerado um fluoróforo natural, essa modificação possibilita a realização de ensaios de permeabilidade de membrana. Como esperado, o aumento de cargas positivas na extremidade N-terminal do peptídeo melhorou significativamente sua atividade antimicrobiana, sobretudo contra cepas Gram-negativas, em comparação ao peptídeo nativo (CRUSCA *et al.*, 2011). Além disso, Silva e colaboradores (2013) mostraram a atividade antimicrobiana e antibiofilme da Lys-a1, em baixas concentrações, contra bactérias do gênero *Streptococcus*.

A obtenção de AMPs sintéticos tem sido realizada com o intuito de obter peptídeos com as características antimicrobianas dos AMPs originais conservadas, mas com as regiões responsáveis pelo efeito citotóxico alteradas (LEE *et al.*, 2013). Além disso, peptídeos com alvo específico têm sido utilizados em pesquisas recentes. Tais moléculas ganham regiões de reconhecimento para um determinado micro-organismo, possibilitando a atuação do AMP sem alterar a microbiota natural (HE *et al.*, 2009; LI *et al.*, 2010b).

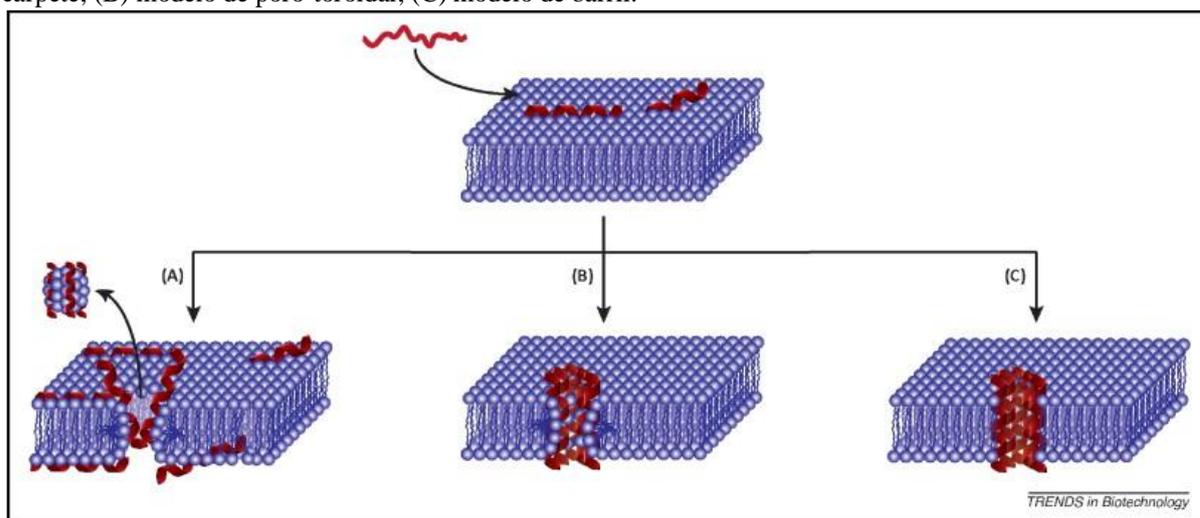
#### **4.4 Mecanismo de ação**

Os mecanismos de ação dos AMPs ainda não estão completamente esclarecidos. Todavia, algumas teorias sobre a ação destas moléculas na membrana celular bacteriana têm sido sugeridas através de métodos como microscopia associada à fluoróforos, dicroísmo circular, espectrometria de massa e estudos com modelos de membrana (BROGDEN, 2005; PAULSEN *et al.*, 2013; BOLINTINEANU; VIVCHARUK; KAZNESSIS, 2012). Dentre os principais mecanismos de atividade biocida sugeridos para os AMPs, têm-se os modelos de morte celular por via extracelular e os modelos por via intracelular (BROGDEN, 2005).

A morte celular mediada por peptídeos geralmente é rápida. De acordo com Brogden (2005), alguns peptídeos ocasionam a morte bacteriana em torno de 15 a 90 minutos de contato. Inicialmente os AMPs aniônico ou catiônico são atraídos à superfície do micro-organismo por interações eletrostáticas com as estruturas da superfície celular. Nas bactérias Gram-negativas, as interações ocorrem entre peptídeos catiônicos e a rede de cargas negativas

presente no envelope bacteriano, formada por fosfolípidios aniônicos e grupos fosfatos nos lipopolisacarídeos. Enquanto que, em bactérias Gram-positivas, esta interação é estabelecida pelos ácidos teicóicos da superfície celular. Após a atração inicial, os AMPs se ligam à superfície celular, onde irá ocorrer a passagem através da membrana externa, permitindo que estes interajam diretamente com a membrana citoplasmática (BROGDEN, 2005). Em baixas proporções, os AMPs são ligados de forma paralela à bicamada lipídica. À medida que tal proporção aumenta, os peptídeos iniciam a sua orientação para o interior da célula, gerando a formação de poros na membrana, que acarretam na morte celular por perda de líquido citoplasmático (PAULSEN *et al.*, 2013). Apesar de aparentemente simples, alguns modelos têm sido propostos para melhor entender a dinâmica dos danos gerados pelos AMPs na membrana (Figura 6).

Figura 6 – Representação do mecanismo de interação entre os AMPs e a membrana celular: (A) modelo de tapete; (B) modelo de poro-toroidal; (C) modelo de barril.



Fonte: SALWICZEK *et al.*, 2014.

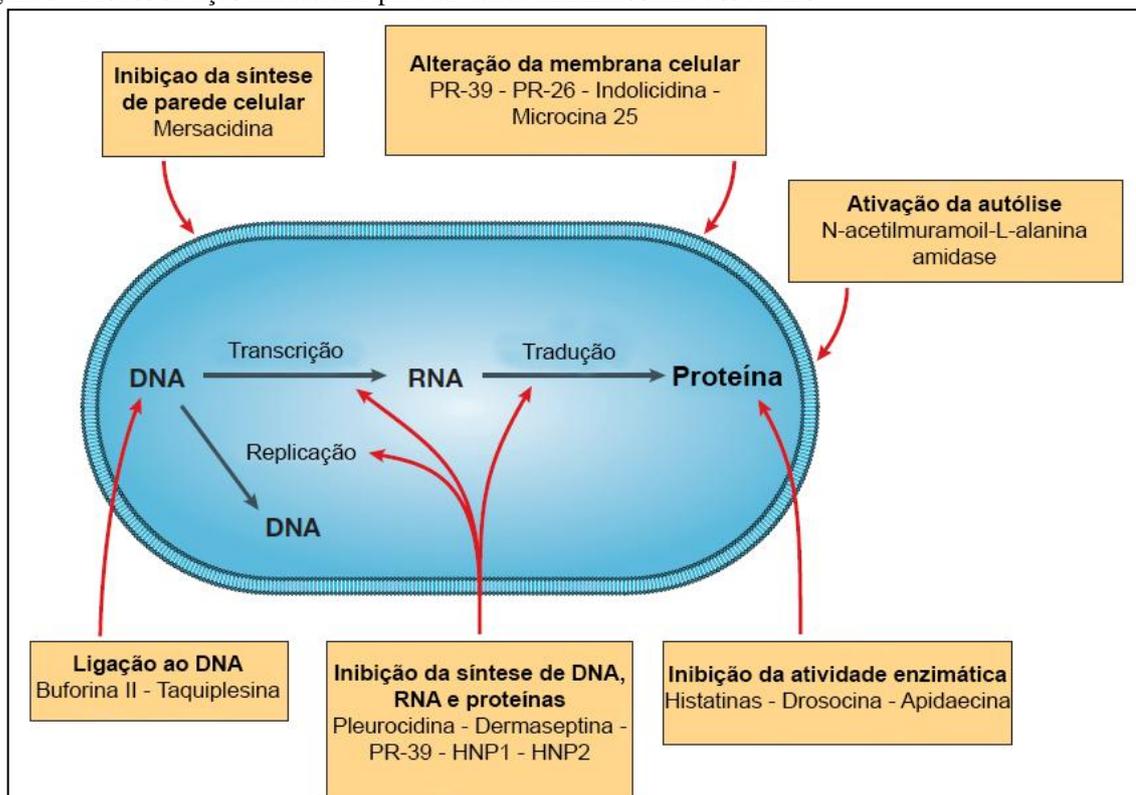
No modelo de tapete ou “carpet model”, os peptídeos são atraídos de forma eletrostática pelas extremidades aniônicas fosfolipídicas e se acumulam na superfície da bicamada lipídica. Em altas concentrações, são induzidos a penetrarem na membrana celular e romperem a integridade da mesma de uma forma semelhante aos detergentes, levando a formação de micelas. Em concentrações críticas, os peptídeos formam cavidades na membrana, o que permite o acesso de mais peptídeos, acarretando na desintegração da bicamada lipídica (BROGDEN, 2005; SALWICZEK *et al.*, 2014) (Figura 6A).

No modelo de poro-toroidal ou “toroidal-pore model” a inserção das hélices dos AMPs na membrana induz a ligação de uma das monocamadas lipídicas à outra contraposta de forma contínua e bilateral, ocorrendo a associação da face polar do peptídeo com a

superfície polar estabelecida pelas extremidades fosfolipídicas da membrana celular, formando um poro curvado para o interior da célula de uma forma contínua (Figura 6B). No modelo de barril ou “barrel-stave”, os peptídeos estão inseridos no núcleo hidrofóbico da membrana formando um poro em formato de “barril”, que permite o fluxo de conteúdo intracelular para o meio externo (BROGDEN, 2005; SALWICZEK *et al.*, 2014) (Figura 6C).

Muito embora a lise da membrana celular leve à morte bacteriana, estudos relatam a existência de outros métodos de morte celular, tais como a ligação dos AMPs a alguns alvos intracelulares importantes. Como exemplos de tais atividades têm-se a inibição da síntese de DNA, RNA e proteínas, geralmente relacionada com a pleurocidina,  $\alpha$ -defensina-1 e  $\alpha$ -defensina-2, e a inibição da atividade enzimática, associada às histatinas (BROGDEN, 2005; MARR; MCGUIRE; MCMASTER, 2012; TEIXEIRA; FEIO; BASTOS, 2012) (Figura 7).

Figura 7 - Modos de ação intracelular para atividade antimicrobiana dos AMPs.



Fonte: modificado de BROGDEN, 2005.

Todos estes mecanismos eventualmente não acontecem de forma independente, mas sim de forma correlacionada e gradual. Além disso, diversos fatores podem estar intimamente associados à efetividade e especificidade do peptídeo à membrana celular, tais como o seu tamanho, sequência de aminoácidos, carga, estrutura e conformação, hidrofobicidade e anfipaticidade (BROGDEN, 2005).

## *Capítulo 5 – Objetivos*

---

## 5 OBJETIVOS

### 5.1 Objetivo Geral

- Verificar a influência do peptídeo Lys-[Trp<sup>6</sup>]hy-a1 na atividade antibacteriana de ciprofloxacina (CIP) contra o micro-organismo patogênico *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027.

### 5.2 Objetivos Específicos

- Avaliar a atividade antibacteriana da Lys-a1 e da CIP durante o crescimento planctônico de *P. aeruginosa* ATCC 9027 (estabelecimento de CIM e CBM).
- Verificar a concentração mínima da Lys-a1 que potencializa a atividade antibacteriana da CIP sobre *P. aeruginosa* ATCC 9027.
- Delinear a cinética de morte de *P. aeruginosa* ATCC 9027 quando submetida à ação bactericida da CIP, sozinha e combinada com a Lys-a1.
- Avaliar a atividade da CIP e da Lys-a1, isoladamente e em combinação, na formação do biofilme de *P. aeruginosa* ATCC 9027.
- Verificar a concentração da CIP, em combinação com a Lys-a1, efetiva contra o biofilme pré-formado de *P. aeruginosa* ATCC 9027.

*Capítulo 6 – Materiais e Métodos*

---

## 6 MATERIAIS E MÉTODOS

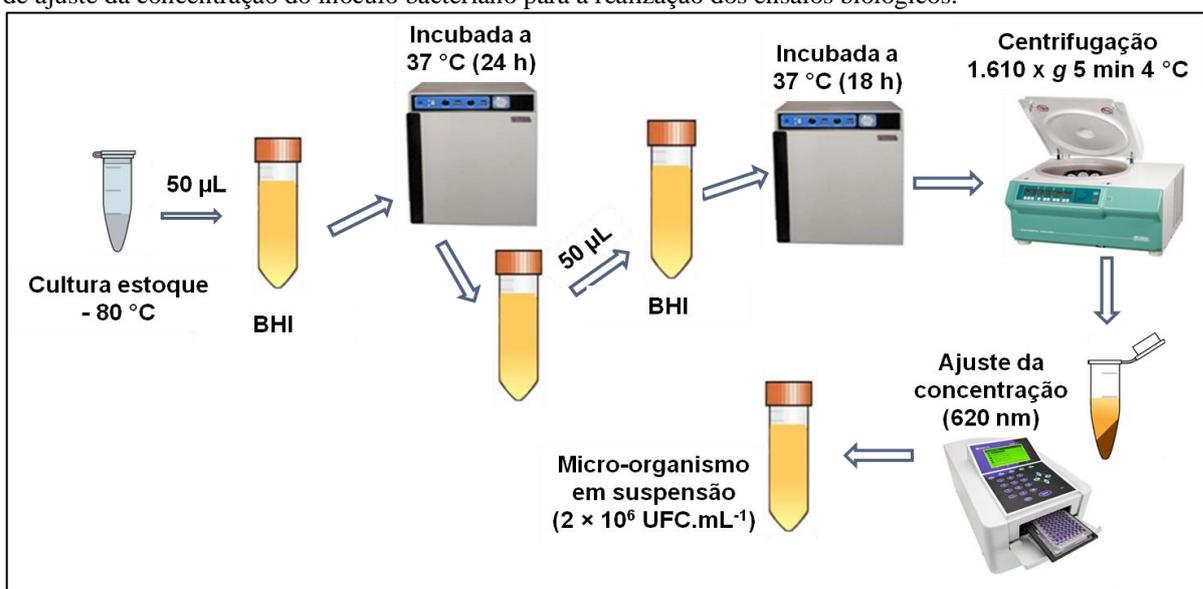
### 6.1 Cepa bacteriana e condições de cultivo

A cepa bacteriana utilizada neste estudo foi a *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 disponibilizada pela Fundação Oswaldo Cruz – FIOCRUZ, Rio de Janeiro - Brasil.

Uma cultura estoque da bactéria foi mantida conservada em meio Brain Heart Infusion (BHI; M210-500G, HIMEDIA) com 20% de glicerol a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Para ativação da cepa, uma alíquota de  $50\text{ }\mu\text{L}$  foi inoculada em  $5\text{ mL}$  de meio BHI caldo estéril e incubada a  $37^{\circ}\text{C}$  por 24 h em condições aeróbicas. Após esta ativação, a cultura foi renovada inoculando-se uma alíquota de  $50\text{ }\mu\text{L}$  em  $5\text{ mL}$  de meio BHI caldo estéril, mantendo as mesmas condições de crescimento por 18 h, período em que as células atingem a fase de crescimento exponencial de acordo com a curva de crescimento previamente estabelecida (Figura 8).

Para serem utilizadas nos ensaios biológicos, as células bacterianas na fase de crescimento exponencial foram colhidas por centrifugação em centrífuga refrigerada (VS-15000CFNII, VISION) a  $1.610 \times g$  durante 5 min, a  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ , e ressuspendidas em meio de cultura BHI caldo estéril. Foi verificada a densidade óptica (DO) com o auxílio de um leitor de microplacas (BioTrak II, Amersham Biosciences) a  $620\text{ nm}$ , a partir da qual pôde-se ajustar a concentração para  $2 \times 10^6\text{ UFC.mL}^{-1}$  (Figura 8).

Figura 8 – Representação esquemática das condições de cultivo da *P. aeruginosa* ATCC 9027 e do procedimento de ajuste da concentração do inóculo bacteriano para a realização dos ensaios biológicos.



Fonte: Próprio autor.

## 6.2 Síntese, purificação e preparação da solução do peptídeo Lys-a1

O peptídeo Lys-a1 foi gentilmente cedido pelo grupo de pesquisa do prof. Dr. Eduardo Cilli da Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho (UNESP), o qual foi sintetizado e purificado segundo metodologia publicada por Crusca e colaboradores (2011). O peptídeo foi inicialmente dissolvido em água deionizada estéril com 0,1% de ácido acético à concentração de  $4.000 \mu\text{g.mL}^{-1}$  e armazenado em freezer  $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ . Para utilização nos ensaios biológicos a concentração foi ajustada pela adição de meio de cultura BHI caldo estéril.

## 6.3 Preparação da solução do antibiótico ciprofloxacina

A solução do antibiótico ciprofloxacina ( $2 \text{ mg.mL}^{-1}$ ) foi adquirida comercialmente e devidamente diluída em meio de cultura BHI caldo estéril até a concentração desejada para utilização nos ensaios biológicos.

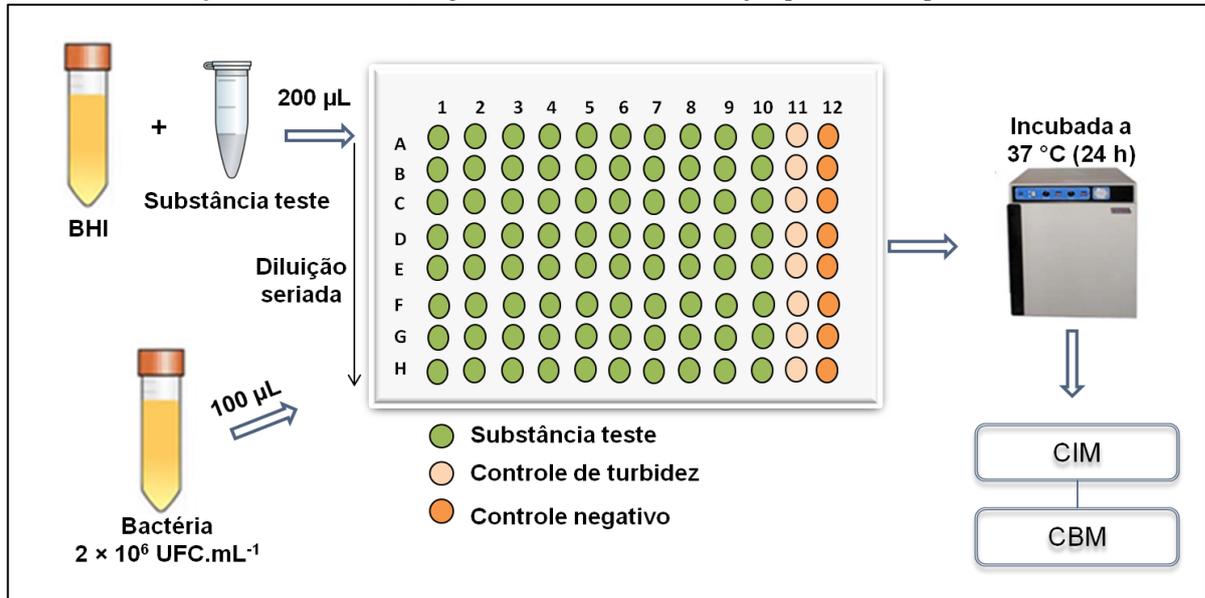
## 6.4 Ensaio de atividade antimicrobiana

A atividade antibacteriana do peptídeo Lys-a1 e do antibiótico CIP foi verificada segundo o teste de microdiluição em placas de poliestireno de 96 poços, padronizada segundo a diretriz M07 – A 9ª edição, *Metodologia para Testes de Sensibilidade aos Antimicrobianos por Diluição para Bactérias de Crescimento Aeróbico* (CLSI, 2012).

Para o teste com a Lys-a1, cada poço da placa foi preenchido com  $100 \mu\text{L}$  de meio de cultura BHI caldo estéril com exceção da primeira linha, a qual foi preenchida com  $200 \mu\text{L}$  de Lys-a1 na concentração de  $500 \mu\text{g.mL}^{-1}$  já dissolvido com o mesmo meio de cultura. Para o teste com a CIP, cada poço da placa foi também preenchido com  $100 \mu\text{L}$  de meio de cultura BHI caldo estéril com exceção da primeira coluna, a qual foi preenchida com  $200 \mu\text{L}$  de CIP na concentração de  $0,97 \mu\text{g.mL}^{-1}$ . Realizou-se diluições seriadas na base dois para obtenção de diferentes concentrações da Lys-a1 ( $500$  a  $15,62 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ) e da CIP ( $0,97$  a  $0,03 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ) em um volume final de  $100 \mu\text{L}$ . Em seguida  $100 \mu\text{L}$  de bactéria  $2 \times 10^6 \text{ UFC.mL}^{-1}$  foram adicionados aos poços da placa obtendo um volume final de  $200 \mu\text{L}$  com concentração bacteriana de  $1 \times 10^6 \text{ UFC.mL}^{-1}$ . A concentração final das substâncias variou de  $250$  a  $7,8 \mu\text{g.mL}^{-1}$  para a Lys-a1 e de  $0,48$  a  $0,015 \mu\text{g.mL}^{-1}$  para a CIP. Poços que continham apenas inóculo e meio de cultura BHI caldo estéril foram utilizados como controle de crescimento da bactéria e poços que continham os tratamentos antimicrobianos sem a presença de inóculo

foram utilizados como controle de turbidez. A placa foi incubada a 37 °C por 24 h em condições aeróbicas para determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e da Concentração Bactericida Mínima (CBM) de cada substância (Figura 9).

Figura 9 – Representação esquemática da metodologia utilizada para determinar a CIM e CBM da Lys-a1 e da CIP contra *P. aeruginosa* ATCC 9027, segundo o teste de microdiluição padronizado pelo CLSI.



Fonte: Próprio autor.

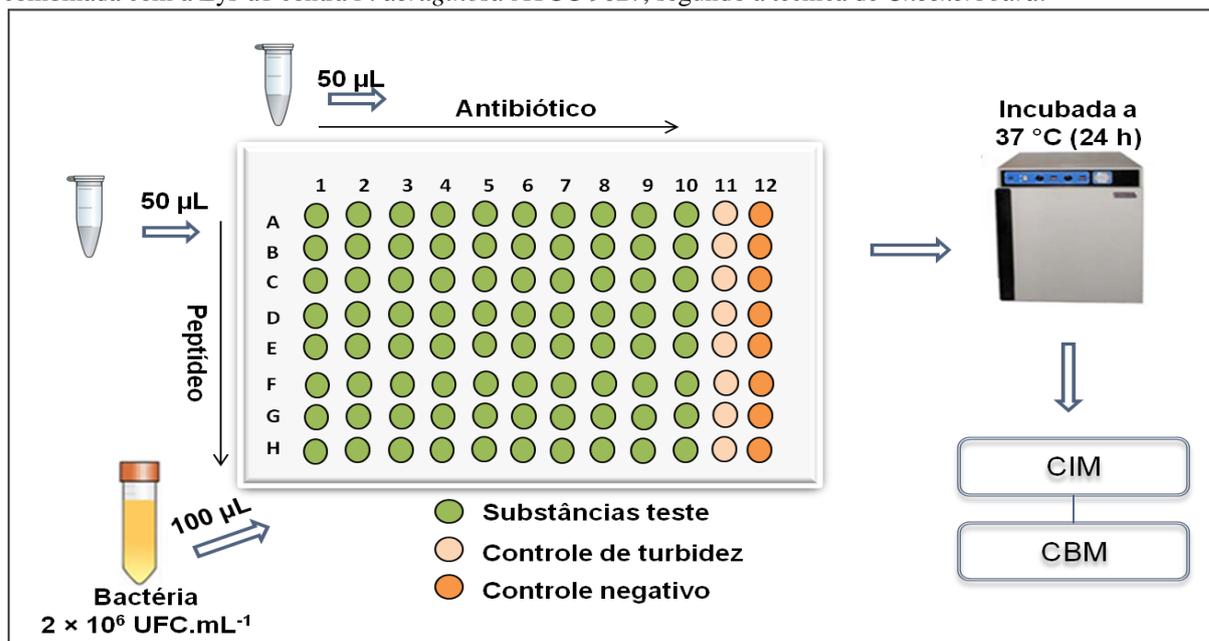
Foi considerada CIM a menor concentração de Lys-a1 e de CIP capaz de inibir visualmente o crescimento bacteriano após 24 h de incubação. Para determinar a CBM, 10 µL dos poços onde não houve crescimento microbiano visível foram inoculados em placas de petri contendo meio de cultura BHI ágar estéril. Após um período de 24 h de incubação a 37°C em condições aeróbicas, foi considerado CBM a menor concentração capaz de inibir completamente o crescimento microbiano na superfície de ágar.

### 6.5 Ensaio de *checkerboard*

A atividade antimicrobiana do antibiótico CIP em combinação com o peptídeo Lys-a1 foi determinada pela técnica de *Checkerboard* (WHITE *et al.*, 1996). Inicialmente as substâncias foram diluídas em meio BHI caldo estéril em diferentes concentrações e combinadas pela adição de 50 µL de cada substância aos poços da placa de microtitulação no sentido vertical (Lys-a1) e horizontal (CIP). Em seguida foi acrescentado 100 µL de bactéria  $2 \times 10^6$  UFC.mL<sup>-1</sup>, obtendo um volume final de 200 µL em cada poço com concentração bacteriana de  $1 \times 10^6$  UFC.mL<sup>-1</sup> e com a concentração final das substâncias variando de 125 a

0,97  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  para a Lys-a1 e de 0,48 a 0,003  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  para a CIP. Poços que continham apenas inóculo e meio de cultura BHI caldo estéril foram utilizados como controle de crescimento da bactéria e poços que continham apenas os tratamentos antimicrobianos foram utilizados como controle de turbidez. A placa foi incubada a 37 °C por 24 h em condições aeróbicas para determinação da CIM e da CBM das substâncias combinadas (Figura 10).

Figura 10 – Representação esquemática da metodologia utilizada para determinar a CIM e CBM da CIP combinada com a Lys-a1 contra *P. aeruginosa* ATCC 9027, segundo a técnica de *Checkerboard*.



Fonte: Próprio autor.

Para determinação da CIM do antibiótico CIP em combinação com a Lys-a1, foi considerada a menor concentração da CIP em combinação com a Lys-a1 capaz de inibir visualmente o crescimento bacteriano após 24 h de incubação. Além disso, a inibição do crescimento planctônico foi visualizada através de leitura espectrofotométrica na DO de 620 nm. Para determinar a CBM, 10  $\mu\text{L}$  dos poços onde não houve crescimento microbiano visível foram inoculados em placas de petri contendo meio de cultura BHI ágar estéril. Foi considerado CBM a menor concentração capaz de inibir completamente o crescimento microbiano na superfície de ágar após 24 horas de incubação a 37 °C em condições aeróbicas.

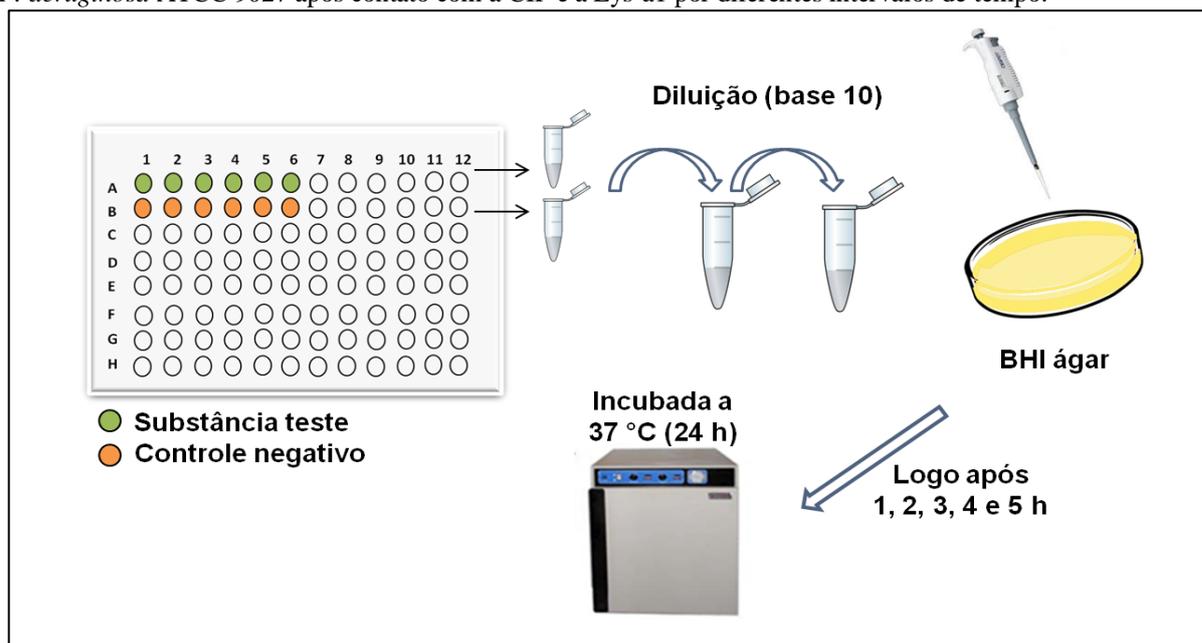
O Índice de Concentração Inibitória Fracional (ICIF) é definido como a soma da CIM das substâncias, quando utilizadas em combinação, dividida pela soma da CIM das substâncias isoladas. Assim, a interpretação foi categorizada da seguinte forma: sinergismo ( $\text{ICIF} \leq 0,5$ ), aditivo ( $0,5 < \text{ICIF} \leq 1$ ), indiferente ( $1 < \text{ICIF} \leq 4$ ) ou antagonismo ( $\text{ICIF} > 4,0$ ) (HAMOUD *et al.*, 2013; LEWIS *et al.*, 2002).

## 6.6 Curva do tempo de morte

O ensaio para definir o tempo de morte consistiu na medição do número de células bacterianas viáveis de *P. aeruginosa* quando submetida à ação bactericida da CIP sozinha e combinada com a Lys-a1. Após a bactéria atingir a fase log de crescimento, a concentração das células no inóculo foi ajustada para  $2 \times 10^6$  UFC.mL<sup>-1</sup>. Em seguida essa suspensão de células foi incubada aerobicamente em uma placa de microtitulação de 96 poços por 24 horas a 37 °C em contato com a CBM obtida para a CIP sozinha e combinada com a Lys-a1 (Figura 11). A quantidade de bactéria e de substância teste em cada poço da placa foi semelhante à utilizada nos testes de determinação da CIM e da CBM. Inóculo com meio de cultura BHI caldo estéril foi utilizado como controle de crescimento da bactéria (Figura 11).

Imediatamente ao preenchimento da placa e após 1, 2, 3, 4 e 5 h, 10 µL da suspensão de células cada poço da placa foram colhidos, reunidos e procedeu-se com diluição em série na base 10 em solução estéril de NaCl 0,15 M. Em seguida inoculou-se 10 µL de cada diluição, contendo a suspensão bacteriana, em placas de petri com BHI ágar estéril e incubou-se por 24 h a 37 °C em condições aeróbicas. Em seguida, as Unidades Formadoras de Colônias (UFC's) foram contadas, e realizada a correção do número de células multiplicando o número de UFC pela diluição, o qual foi expresso como UFC.mL<sup>-1</sup> (Figura 11).

Figura 11 – Representação esquemática da metodologia utilizada para determinar a curva de tempo de morte de *P. aeruginosa* ATCC 9027 após contato com a CIP e a Lys-a1 por diferentes intervalos de tempo.



Fonte: Próprio autor.

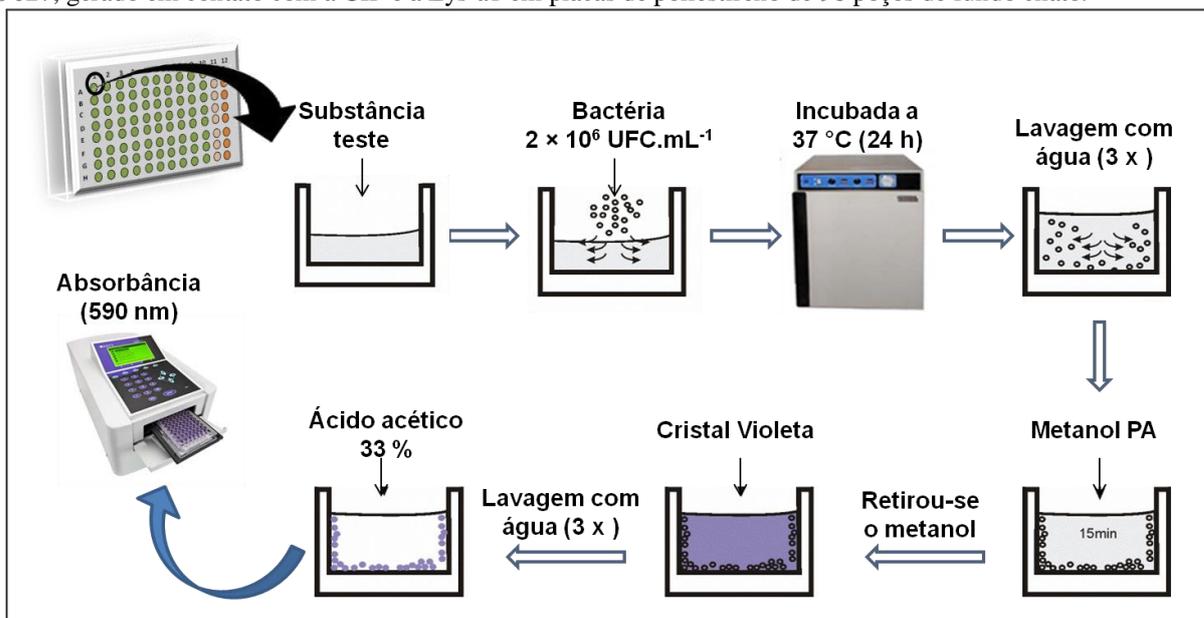
## 6.7 Ensaio de atividade antibiofilme

O efeito do peptídeo Lys-a1 e do antibiótico CIP na formação do biofilme de *P. aeruginosa* foi verificado pelo método descrito por O'toole e Kolter (1998) com algumas modificações. As placas de poliestireno de fundo chato foram montadas como descrito no item 6.4. Após 24 h de incubação aeróbica a 37 °C a biomassa do biofilme formado foi quantificada através da coloração com Cristal Violeta (CV) como descrito a seguir.

### 6.7.1 Quantificação da biomassa

Para a quantificação da biomassa, as bactérias planctônicas foram removidas e os poços lavados com água destilada. Após secagem da placa a temperatura ambiente, 200 µL de álcool metílico PA foram adicionados e deixados por 15 minutos para fixação das células aderidas. Após a remoção do metanol, 200 µL de CV 0,1% foram adicionados por 10 minutos para permitir uma quantificação indireta da biomassa através da coloração. Em seguida o CV foi removido e repetiu-se o processo de lavagem e secagem da placa e foram adicionados 200 µL de ácido acético 33% por 10 minutos para dissolução do corante preso ao biofilme. A suspensão obtida em cada poço foi transferida para uma nova placa de 96 poços onde foi realizada a medição da absorbância em um leitor de microplacas a 590 nm (Figura 12).

Figura 12 – Representação esquemática da metodologia de quantificação do biofilme de *P. aeruginosa* ATCC 9027, gerado em contato com a CIP e a Lys-a1 em placas de poliestireno de 96 poços de fundo chato.



Fonte: Próprio autor.

## 6.8 Ensaio de *checkerboard* na formação do biofilme

O efeito do antibiótico CIP em combinação com o peptídeo Lys-a1 na formação do biofilme de *P. aeruginosa* foi realizado pelo método descrito por O'toole e Kolter (1998), em placa de poliestireno de fundo chato com algumas modificações. As placas foram montadas como descrito no item 6.5. Após 24 h de incubação aeróbica em estufa a 37 °C para a formação do biofilme precedeu-se com a quantificação da biomassa com CV, conforme descrito no item 6.7.1.

## 6.9 Ensaio de susceptibilidade do biofilme pré-formado

Para verificar o efeito da CIP sozinha e combinada com a Lys-a1 sobre o biofilme pré-formado de *P. aeruginosa*, a bactéria foi crescida até a fase log, a concentração das células foi ajustada para  $1 \times 10^6$  UFC.mL<sup>-1</sup> e incubada em placa de poliestireno de 96 poços de fundo chato por 12 horas em condições aeróbicas a 37 °C para a formação do biofilme.

Após o período de crescimento do biofilme, as células planctônicas foram removidas e os poços lavados três vezes com solução de NaCl 0,15 mM estéril. Em seguida os poços contendo o biofilme de 12 horas foram preenchidos com 200 µL das substâncias teste em concentrações acima da CBM. Aos poços da placa onde estavam o controle negativo e o controle de turbidez foi acrescentado apenas meio de cultura BHI caldo estéril. A placa foi novamente incubada aerobicamente em estufa por 5 h a 37 °C.

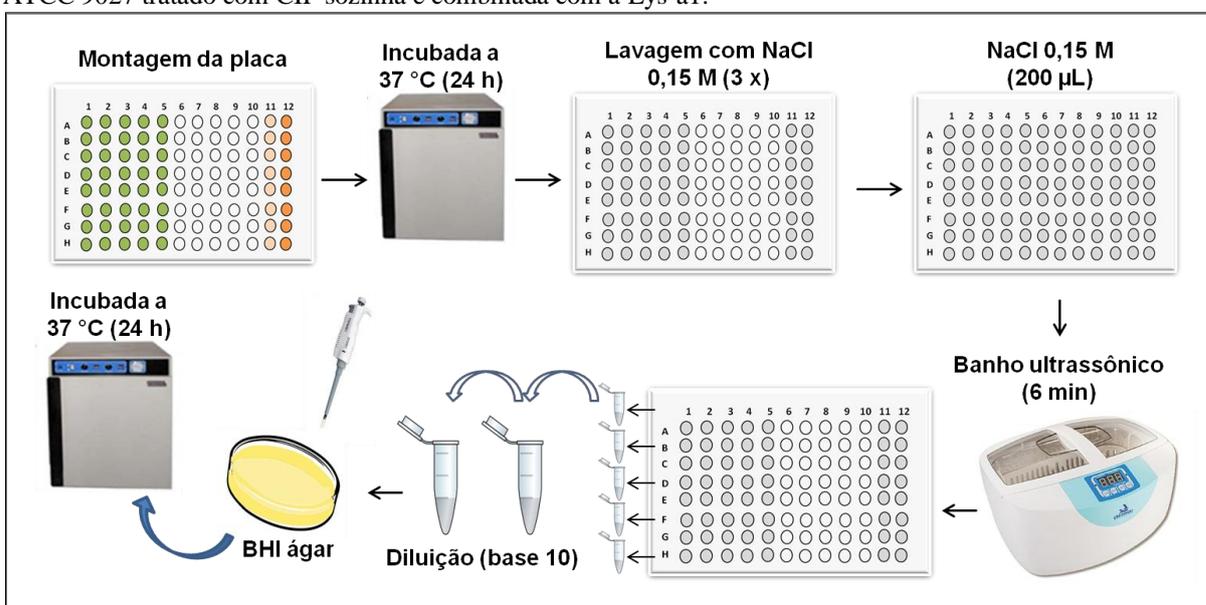
Após o tempo de tratamento ao biofilme, as substâncias foram removidas, os poços lavados 3 vezes com solução de NaCl 0,15 mM estéril e em seguida foram acrescentados 200 µL de meio de cultura BHI caldo estéril. A placa foi novamente incubada aerobicamente em estufa a 37 °C por 24 h e, após este tempo, foi submetida à quantificação da biomassa por CV, conforme descrito no item 6.7.1 e a contagem de UFC's para verificar a viabilidade celular no biofilme após a ação das substâncias, como descrito a seguir.

### 6.9.1 Contagem das UFCs

Inicialmente as bactérias planctônicas foram removidas e os poços, da placa de microtitulação, foram lavados três vezes com solução de NaCl 0,15 M estéril para remoção das células fracamente aderidas. Em seguida, cada poço foi preenchido com 200 µL de solução de NaCl 0,15 M estéril e a placa foi submetida a banho ultrassônico (Cuba de Ultra-

Som – CRISTÓFOLI) por 6 minutos para a liberação das células incrustadas na matriz polimérica do biofilme. A suspensão de células foi coletada com uma pipeta automática através do movimento up-down, reunida em eppendorf estéril e foi realizada diluição seriada na base dez em solução de NaCl 0,15 M estéril. A partir de cada diluição obtida, inoculou-se 10  $\mu\text{L}$  em placas de petri contendo meio de cultura BHI ágar estéril, as quais foram incubadas aerobicamente em estufa a 37 °C durante 24 horas. Após este período procedeu-se com a contagem do número de colônias para cada diluição e foi realizada a correção do número de células multiplicado-se o número de UFCs presente na superfície de ágar pela diluição. Os resultados de todas as contagens foram expressos como  $\text{UFC.mL}^{-1}$  (Figura 13).

Figura 13 – Representação esquemática da metodologia de quantificação das UFCs do biofilme de *P. aeruginosa* ATCC 9027 tratado com CIP sozinha e combinada com a Lys-a1.



Fonte: Próprio autor.

## 6.10 Análise estatística

Todos os experimentos foram realizados em triplicata com os respectivos resultados categorizados em Microsoft Excel (Versão 2012 para Windows) e posteriormente analisadas no software GraphPad Prism (Versão 5.0 para Windows, San Diego California USA). As diferenças significativas entre os grupos foram verificadas através da aplicação do teste One-way ANOVA com pós-teste de Bonferroni. Os dados foram considerados estatisticamente significantes quando  $p < 0,01$ .

## *Capítulo 7 – Resultados e Discussão*

---

## 7 RESULTADOS E DISCUSSÃO

As bactérias possuem uma capacidade extraordinária para se adaptarem ao meio ambiente, possibilitando o sucesso no desenvolvimento de mecanismos de resistência aos antimicrobianos durante o tratamento de infecções. Assim, se torna necessário a busca por estratégias que minimize este processo, seja pelo melhor entendimento dos mecanismos de resistência ou pela descoberta de novos compostos com eficiente efeito terapêuticos (FERNÁNDEZ; BREIDENSTEIN; HANCOCK, 2011). Nesta última perspectiva, muitos compostos naturais e sintéticos têm sido cada vez mais estudados, dentre os quais se destacam os AMPs, moléculas importantes envolvidas na imunidade inata dos seres vivos.

Peptídeos produzidos por várias espécies, incluindo bactérias, insetos, plantas e vertebrados, tem se mostrado como excelentes agentes antimicrobianos contra uma variedade de micro-organismos, incluindo bactérias Gram-negativas, Gram-positivas, fungos e vírus (LI *et al.*, 2012b). Neste estudo verificou-se a influência do peptídeo sintético Lys-a1 na atividade antibacteriana do antibiótico CIP durante o crescimento planctônico, na formação de biofilme e sobre o biofilme pré-formado de *P. aeruginosa* ATCC 9027.

### 7.1 Determinação da CIM e da CBM

A atividade antibacteriana do antibiótico CIP e do peptídeo Lys-a1 sobre a cepa *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 foi avaliada através do método de microdiluição em caldo utilizando placas de poliestireno de 96 poços (CLSI, 2012). De acordo com o CLSI (2012), a CIM é a menor concentração do agente antimicrobiano que impede o crescimento visível de um micro-organismo em testes de sensibilidade por diluição em ágar ou caldo.

Os resultados mostram que a CIP interfere de forma bastante relevante no crescimento planctônico de *P. aeruginosa*, apresentando CIM de  $0,24 \mu\text{g.mL}^{-1}$  (Tabela 1). Isso demonstra que a cepa testada é susceptível à ação antibacteriana deste antibiótico, o que já era esperado pelo fato do mesmo possuir indicação para uso clínico contra esta bactéria (CLSI, 2013). Além disso, resultado semelhante foi obtido por Berlanga e colaboradores (2004), quando testaram a sensibilidade de bactérias Gram-negativas e Gram-positivas para a CIP, obtendo uma CIM de  $0,25 \mu\text{g.mL}^{-1}$  contra a cepa *P. aeruginosa* ATCC 9027.

No que concerne a atividade antibacteriana do peptídeo Lys-a1, este também foi capaz de interferir de forma significativa no crescimento planctônico de *P. aeruginosa* apresentando CIM de  $125 \mu\text{g.mL}^{-1}$  (Tabela 1). A atividade antimicrobiana da Lys-a1 foi

inicialmente estudada por Crusca Jr e colaboradores (2011). Neste estudo foi demonstrando uma ação antibacteriana durante o crescimento planctônico de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, incluindo a cepa *P. aeruginosa* ATCC 27853. Recentemente também foi demonstrado efeito antibacteriano deste peptídeo em baixas concentrações sobre bactérias do gênero *Streptococcus* (SILVA *et al.*, 2013). Além disso, outros peptídeos com atividade contra *P. aeruginosa* têm sido estudados, mostrando resultados bastante significativos (PASUPULETI *et al.*, 2009; RASUL *et al.*, 2010; MIN *et al.*, 2012; TORCATO *et al.*, 2013).

A atividade bactericida da CIP e da Lys-a1 sobre *P. aeruginosa* foi analisada através do método de determinação da Concentração Bactericida Mínima (CBM), pelo qual foi estabelecida a quantidade mínima das substâncias capaz de matar as células bacterianas. A CBM obtida para a CIP foi de  $0,48 \mu\text{g.mL}^{-1}$ , valor este abaixo do índice bactericida obtido para outras bactérias Gram-negativas (BERLANGA *et al.*, 2004). Para a Lys-a1 este valor foi de  $125 \mu\text{g.mL}^{-1}$ , apresentando-se dentro da faixa dos valores mostrados por Silva e colaboradores (2013) ao verificarem a CBM deste peptídeo sobre bactérias Gram-positivas. Logo, tanto o antibiótico quanto o peptídeo têm potencial bactericida contra *P. aeruginosa* ATCC 9027 (Tabela 1).

Tabela 1 – CIM e CBM da CIP e da Lys-a1 sobre a cepa *P. aeruginosa* ATCC 9027.

Cepa	CIP $\mu\text{g.mL}^{-1}$		Lys-a1 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	
	CIM	CBM	CIM	CBM
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 9027	0,24	0,48	125	125

Fonte: Próprio autor. CIM: Concentração Inibitória Mínima; CBM: Concentração Bactericida Mínima; CIP: Ciprofloxacina; Lys-a1: Lys-[Trp<sup>6</sup>]hy-a1.

Os antibióticos fluoroquinolonas apresentam um largo espectro de atividade antimicrobiana efetiva contra uma variedade de micro-organismos, incluindo bactérias Gram-negativas patogênicas. No entanto, a utilização em larga escala destes antibióticos vem possibilitando o desenvolvimento de cepas bacterianas resistentes, dentre as quais se destaca a *P. aeruginosa* isolada de pacientes com IN (BOLON, 2011; LEE *et al.*, 2010).

A combinação de antibióticos no tratamento destas infecções vem sendo utilizada e demonstra melhores resultados quando comparado à utilização de um único fármaco. Dessa forma, o estudo sobre a combinação de antimicrobianos pode levar ao estabelecimento de estratégias eficientes contra a resistência bacteriana ou até mesmo contribuir para o desenvolvimento de um novo agente antimicrobiano (AHMED; KHAN e KHAN, 2013).

## 7.2 Determinação do ICIF

Este trabalho propõe avaliar a influência do peptídeo Lys-a1 na atividade antibacteriana do antibiótico CIP. Para isso, procedeu-se com o método *in vitro* denominado *Checkerboard*, através do qual se obteve o Índice de Concentração Inibitória Fracional (ICIF). Segundo Tateda e colaboradores (2006) esta metodologia é eficiente para ser utilizada rotineiramente em laboratórios de microbiologia clínica na determinação da atividade de antibióticos combinados.

A tabela 2 apresenta as concentrações sub inibitórias da CIP e da Lys-a1 em diferentes combinações nas quais foi observada inibição do crescimento planctônico de *P. aeruginosa*. Além disso, é apresentado o ICIF obtido para cada combinação e a interpretação da interação estabelecida. O resultado da associação entre as duas substâncias se mostrou indiferente apenas na concentração de 0,12  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  da CIP quando combinada a 62,5  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  de Lys-a1, sendo observada predominantemente interações aditivas e sinérgicas. Vale ressaltar, que nenhuma das combinações testadas apresentou efeito antagônico.

Tabela 2 – Valores e interpretação do ICIF da CIP combinada com a Lys-a1 contra *P. aeruginosa* ATCC 9027.

SUBSTÂNCIAS		ICIF	Interpretação
CIP ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ )	Lys-a1 ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ )		
0,12	62,5	1,00	Indiferente
	31,2	0,75	Aditivo
	15,6	0,62	Aditivo
	7,8	0,56	Aditivo
	3,9	0,53	Aditivo
	1,9	0,51	Aditivo
	0,9	0,50	Sinergismo
0,06	62,5	0,75	Aditivo
	31,2	0,50	Sinergismo
	15,6	0,37	Sinergismo
0,03	62,5	0,62	Aditivo
0,015	62,5	0,56	Aditivo

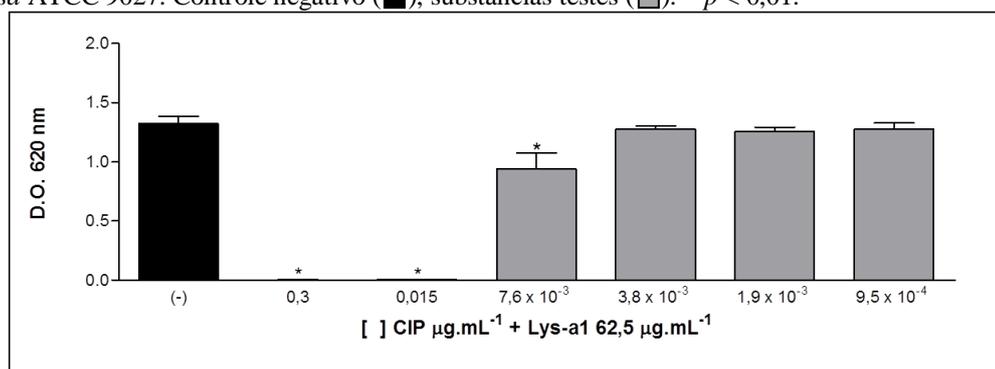
Fonte: Próprio autor. CIP: Ciprofloxacina; Lys-a1: Lys-[Trp<sup>6</sup>]hy-a1; ICIF: Índice de Concentração Inibitória Fracional.

A combinação da CIP com outros antibióticos, tais como  $\beta$ -lactâmicos e cefalosporinas, no tratamento de infecções causadas por *P. aeruginosa* é bastante explorada (NAKAMURA *et al.*, 2014; KATAOKA *et al.*, 2013). No entanto, vários trabalhos têm proposto novas estratégias para a terapia combinada utilizando fito-químicos para potencializar a ação da CIP contra este patógeno (JAYARAMAN *et al.*, 2010; CAI *et al.*, 2008). Nesta perspectiva, vem sendo testado também, a combinação de peptídeos com diversos antibióticos. Choi e Lee (2012) mostraram o efeito sinérgico entre o AMP arenicin-1 e os antibióticos eritromicina, cloranfenicol e ampicilina sobre a *P. aeruginosa*. Estes autores abordam a hipótese de que a formação de radicais hidroxilo foi uma das causas do sinergismo entre arenicin-1 e os antibióticos e que este peptídeo aumentou a permeabilidade da membrana citoplasmática facilitando o acesso dos mesmos aos alvos intracelulares.

A ocorrência de cepas de *P. aeruginosa* resistentes aos antibióticos fluoroquinolonas, em especial a CIP, vem sendo relatada mundialmente (WANG; LEE e PENG, 2014). Dentre as condições que favorecem a aquisição de resistência bacteriana está o uso descontrolado ou a utilização em concentrações elevadas de antibióticos. Neste trabalho foi obtida uma redução de 16 vezes da CIM da CIP quando combinado com a Lys-a1. O resultado da interação entre estas substâncias apresentado na tabela 2 mostra que a menor concentração da CIP com atividade contra a *P. aeruginosa* é  $0,015 \mu\text{g.mL}^{-1}$  quando combinada com  $62,5 \mu\text{g.mL}^{-1}$  de Lys-a1, sendo verificada uma interação do tipo aditiva.

A fim de proporcionar a visualização da inibição do crescimento planctônico de *P. aeruginosa* pela combinação de CIP a  $0,015 \mu\text{g.mL}^{-1}$  com Lys-a1 a  $62,5 \mu\text{g.mL}^{-1}$ , foi feito o monitoramento do crescimento das células através de espectrofotometria na DO de 620 nm. Este resultado pode ser observado na Figura 14, onde se percebe claramente a inibição do crescimento planctônico de *P. aeruginosa* na presença da combinação citada.

Figura 14 – Atividade antibacteriana da CIP combinada com a Lys-a1 sobre o crescimento planctônico de *P. aeruginosa* ATCC 9027. Controle negativo (■), substâncias testes (▒). \*  $p < 0,01$ .



Fonte: Próprio autor.

Para verificar a capacidade bactericida destas combinações, procedeu-se com o método de determinação da CBM e verificou-se que a ação bactericida é proveniente da combinação de CIP a  $0,03 \mu\text{g.mL}^{-1}$  com Lys-a1 a  $62,5 \mu\text{g.mL}^{-1}$ , uma concentração 2 vezes acima da CIM. Portanto, a interação do tipo aditiva com a Lys-a1 estabeleceu uma diminuição de 16 vezes da CIM e da CBM do antibiótico CIP.

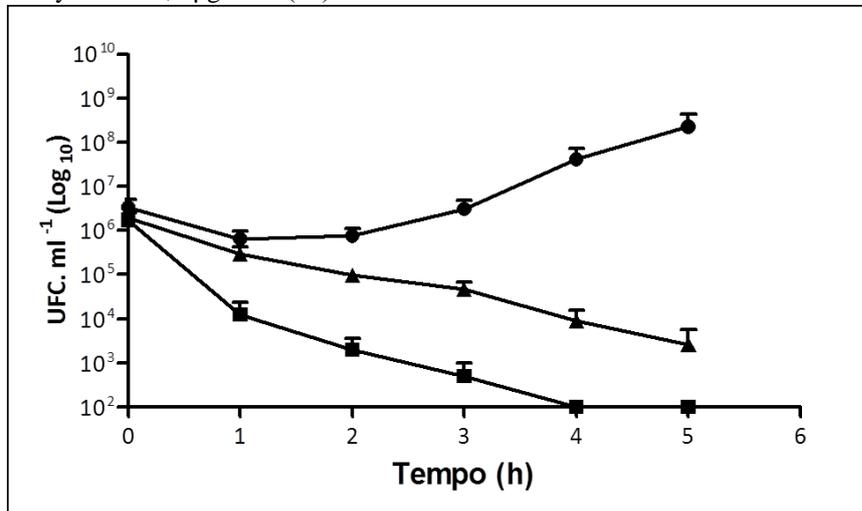
De acordo com Rahal (2006), a razão principal para combinar dois fármacos é aumentar a atividade antimicrobiana pela obtenção de um efeito sinérgico, onde se observa atividade significativamente maior através da combinação do que a prevista pela soma da atividade de cada agente de forma isolada. Ahmed, Khan e Khan (2013) avaliaram a sinergia *in vitro* de três antibióticos contra isolados clínicos de *S. aureus* e *P. aeruginosa*, indicando que a utilização de combinações sinérgicas nas infecções polimicrobianas apresenta melhor resposta clínica do que o uso de combinações não sinérgicas. No entanto, Rahal (2006) também ressalta que a combinação de agentes antibióticos tem por objetivo permitir a utilização de doses mais baixas de uma das substâncias para reduzir a toxicidade e prevenir o surgimento de resistência. Nesta circunstância, a obtenção de sinergia não é obrigatoriamente necessária, sendo aceitáveis também combinações onde se obtém efeito aditivo, ou seja, atividade antimicrobiana igual à soma da atividade dos componentes individuais.

Considerando este ponto de vista, somente a combinação bactericida onde a CIP se apresentou em menor quantidade foi submetida à avaliação pelo estabelecimento da curva de tempo de morte de *P. aeruginosa*.

### 7.3 Curva de tempo de morte

A definição do tempo de morte de *P. aeruginosa* consistiu na medição do número de células bacterianas viáveis quando submetida à ação bactericida da CIP sozinha e combinada com a Lys-a1. De acordo com CLSI (2012) um agente antimicrobiano é bactericida quando provoca uma redução de  $3 \times \log_{10}$  (99,9%) das unidades formadoras de colônias por mililitro ( $\text{UFC.mL}^{-1}$ ). Dessa forma, o resultado confirma a ação bactericida da CIP, sozinha e em combinação com a Lys-a1, sobre *P. aeruginosa* (Figura 15). Observa-se que a ação antibacteriana sobre a cepa teve início nas primeiras horas de tratamento, ocorrendo a redução de três unidades logarítmicas após 3 h de contato com a CIP na concentração de  $0,48 \mu\text{g.mL}^{-1}$  e após 5 h com a combinação entre CIP ( $0,03 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ) e Lys-a1 ( $62,5 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ) (Figura 15).

Figura 15 – Curva de tempo de morte de *P. aeruginosa* ATCC 9027 após contato com a CIP e a Lys-a1 por diferentes intervalos de tempo. Controle negativo (●), CIP sozinho a 0,48  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  (■) e CIP a 0,03  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  em combinação com a Lys-a1 a 62,5  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  (▲).



Fonte: Próprio autor.

Alguns autores consideram a cinética bactericida de um antibiótico significativamente satisfatória quando este é capaz de causar uma redução maior ou igual a 3  $\log_{10}$  CFU. $\text{mL}^{-1}$  do inóculo inicial em até 24 h de incubação a 35 °C. Assim, apesar da combinação de CIP com Lys-a1 demonstrar ação bactericida mais tardia em relação ao antibiótico sozinho, este tempo de ação é considerado bastante significativo (JONES; ANDEREGG e DESHPANDE, 2002).

O antibiótico CIP é comumente utilizado no tratamento de infecções causadas por *P. aeruginosa* (RANG *et al.*, 2007). Entretanto, resistência intrínseca à CIP tem sido observada neste patógeno como resultado da capacidade limitada deste fármaco para penetrar na membrana externa e da ação do eficiente sistema de efluxo que esta bactéria apresenta (LLANES *et al.*, 2011; BERLANGA *et al.*, 2004). Estudos sugerem que a atividade de AMPs catiônicos contra bactérias Gram-negativas é conduzida principalmente por interações eletrostáticas com a camada de lipopolissacarídeo, seguido pela ligação e rompimento da membrana interna (TORCATO *et al.*, 2013). Assim, estas moléculas poderão auxiliar no acesso de antimicrobianos que tenham um sítio específico intracelular.

O peptídeo sintético Lys-a1, utilizado neste estudo, tem um adicional de cargas positivas em relação ao AMP Hy-a1 (CRUSCA *et al.*, 2011). Dessa forma um provável mecanismo de ação da Lys-a1 advém da interação com a rede de cargas negativas da membrana externa de *P. aeruginosa*, formada por fosfolipídios aniônicos e grupos fosfatos da camada de LPS, culminando na lise da célula (TORCATO *et al.*, 2013). Com relação ao

favorecimento na atividade antimicrobiana do antibiótico CIP, este peptídeo ao desestabilizar a membrana celular permite o livre fluxo da CIP para o interior da célula, de forma a superar a expressão o sistema de efluxo, onde interage com o DNA comprometendo a ação das enzimas DNA girase e topoisomerase IV e, conseqüentemente, levando a morte da celular.

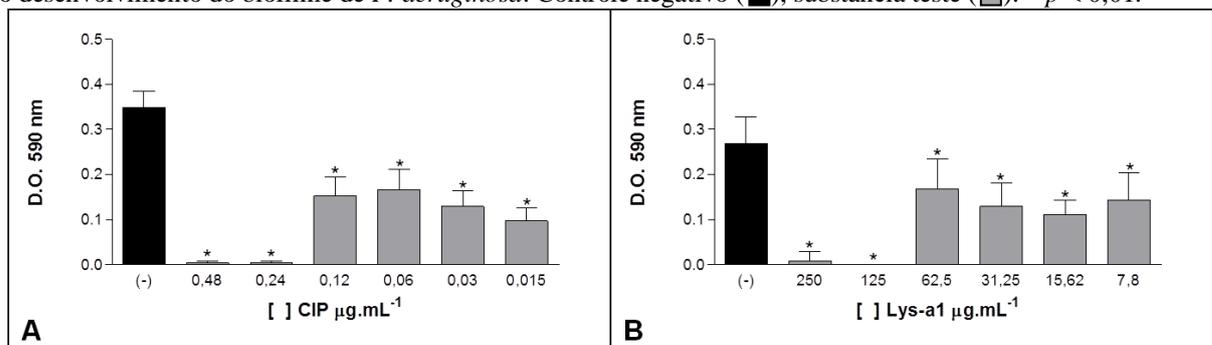
#### 7.4 Atividade antibiofilme

As infecções causadas pelo patógeno *P. aeruginosa* estão frequentemente relacionadas à presença de biofilme. Este evento representa um obstáculo no tratamento clínico por estabelecer uma maior tolerância para a maioria dos antibióticos (DE LA FUENTE-NÚÑEZ *et al.*, 2013). Dessa forma, a CIP e a Lys-a1, sozinhas e combinadas, também foram testadas com relação à capacidade para prevenir a formação de biofilme *in vitro* de *P. aeruginosa* e para combater um biofilme pré-formado.

##### 7.4.1 Quantificação de biomassa

O efeito da CIP e da Lys-a1, na formação do biofilme de *P. aeruginosa* foi avaliado através da quantificação da biomassa pelo método do Cristal Violeta (CV). O resultado mostra que tanto a CIP (Figura 16A) quanto a Lys-a1 (Figura 16B) foram capazes de inibir a formação do biofilme desta bactéria nas concentrações CIM e CBM no período de 24 h de incubação. Contudo, mesmo em concentrações subinibitórias houve interferência no desenvolvimento do biofilme com diferença estatística de  $p < 0,01$  em relação ao controle negativo (Figura 16).

Figura 16 – Avaliação da atividade antibacteriana da CIP (A) e da Lys-a1 (B) em diferentes concentrações sobre o desenvolvimento do biofilme de *P. aeruginosa*. Controle negativo (■), substância teste (□). \*  $p < 0,01$ .



Fonte: Próprio autor.

A capacidade de adesão a uma superfície representa o ponto crucial para o estabelecimento de um biofilme, pois é neste momento que pode ocorrer à ligação irreversível das células e a produção de elementos que favorecem a transição do modo de vida planctônico para a forma séssil (PETROVA e SAUER, 2012). A ação do antibiótico CIP para prevenir a formação de biofilme *in vitro* por *P. aeruginosa*, isolada de pacientes com FC, foi estudada por Fernández-Olmos e colaboradores (2012) a fim de determinarem a concentração de prevenção de biofilme (CPB), definida como a concentração de antibiótico necessária para evitar a formação de biofilme durante a fase inicial de colonização. De acordo com os resultados deste estudo, antibióticos com rápida cinética de morte, como as fluoroquinolonas, apresentaram CPBs idênticas ou ligeiramente superiores aos valores da CIM. Este parâmetro também foi observado neste estudo tanto para a CIP quanto para a Lys-a1, quando se testou a influência destas substâncias na formação do biofilme de *P. aeruginosa*.

Nagant e colaboradores (2010) estudaram os passos iniciais na formação do biofilme em oito cepas de *P. aeruginosa* pela técnica de coloração com CV. Estes autores mostraram que quatro cepas, incluindo a *P. aeruginosa* ATCC 9027, apresentam um biofilme detectável após 6 h de incubação, enquanto que as outras foram capazes de desenvolver biofilme somente após 24h. Este fato justifica a capacidade da CIP de inibir a formação do biofilme de *P. aeruginosa* mostrada neste estudo, uma vez que este antibiótico apresentou cinética de morte contra esta bactéria em um intervalo de tempo inferior a 6 h. No entanto, a contagem de UFC's revelou a presença de células remanescentes viáveis nos poços onde não houve formação de biofilme (dados não apresentados).

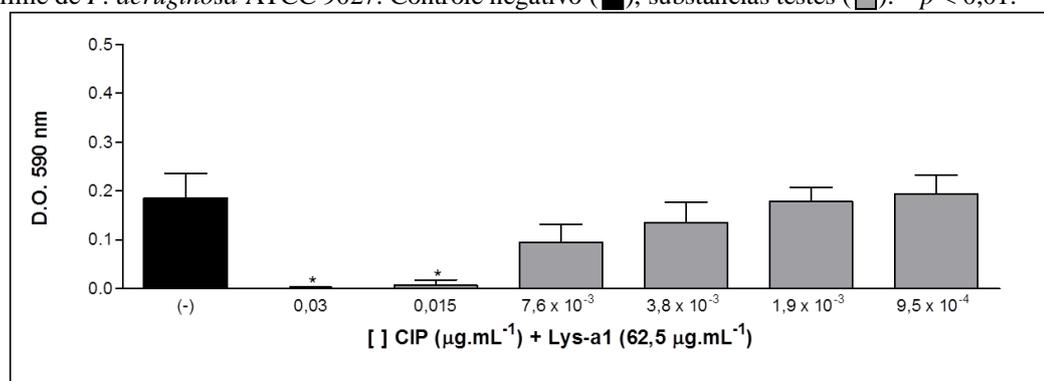
Isso pode ser justificado pelo fato da *P. aeruginosa* apresentar capacidade de fixação em superfície de poliestireno após 30 minutos de contato (NAGANT *et al.*, 2010). Além disso, mesmo antes da formação de um biofilme estruturado ocorre a expressão diferencial de um número importante de genes, alguns dos quais estão relacionados à tolerância aos antibióticos (WHITELEY *et al.*, 2001).

Com relação à interferência da Lys-a1 na formação de biofilme, este evento também foi demonstrado recentemente por Silva e colaboradores (2013) contra bactérias do gênero *Streptococcus*. A capacidade de interferir no estabelecimento de biofilme apresentada pela Lys-a1 pode estar relacionado à atuação sobre a membrana, o que interfere diretamente na atividade metabólica e na viabilidade das células, e conseqüentemente na formação do biofilme. Além disso, as interações entre peptídeos carregados positivamente com as membranas biológicas podem cancelar as forças eletrostáticas destas e interferir na adesão a uma superfície. Isso foi observado em alguns estudos com peptídeos sintéticos que

apresentaram atividade antibiofilme sobre bactérias patogênicas da cavidade oral (HUA; SCOTT; DIAMOND, 2010; LIU *et al.*, 2011; TORCATO *et al.*, 2013).

O resultado da combinação entre a Lys-a1 e a CIP na formação do biofilme, obtido através da quantificação da biomassa pelo CV, mostra a inibição do estabelecimento do biofilme nas concentrações CIM e CBM das substâncias combinadas, ou seja, na presença de 0,015 e 0,03  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  de CIP combinada com 62,5  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  de Lys-a1 (Figura 17). Isso sugere que o peptídeo potencializa a atividade do antibiótico contra a *P. aeruginosa*, não apenas sobre a forma planctônica, mas também contra a formação de biofilme.

Figura 17– Avaliação da atividade antibacteriana da CIP em combinação com a Lys-a1 sobre o desenvolvimento do biofilme de *P. aeruginosa* ATCC 9027. Controle negativo (■), substâncias testes (▒). \*  $p < 0,01$ .



Fonte: Próprio autor.

Kumar, Chhibber e Harjai (2013) estudaram a susceptibilidade de *P. aeruginosa* ao fitoquímico zingeron, um dos principais componente de raiz de gengibre (*Zingiber officinale*), em combinação com o antibiótico CIP. Estes autores demonstraram a inibição da formação do biofilme pela combinação do antibiótico CIP com este fito-químico. Até o presente momento não foi encontrado na literatura qualquer referência com relação à inibição da formação de biofilme de *P.aeruginosa* pela combinação de um AMP com o antibiótico CIP, evidenciando a importância do presente trabalho.

## 7.5 Susceptibilidade do biofilme pré-formado

Neste estudo, as concentrações da CIP, sozinha e combinada com a Lys-a1, que foram capazes de interferir no crescimento planctônico e na formação do biofilme de *P. aeruginosa* não foram efetivas contra o biofilme pré-formado de 12 h, ou seja, não foram capazes de reduzir a biomassa e nem interferir na viabilidade celular (dados não mostrados).

Este fato foi provavelmente resultado dos mecanismos de resistência do biofilme, que estão diretamente relacionados às características de sobrevivência das células microbianas neste sistema. Dentre estas características destacam-se as alterações na expressão de genes, a indução do sistema de bomba de efluxo e a diminuição da taxa de crescimento celular devido o baixo gradiente de oxigênio e nutrientes que existe entre a superfície e o interior do biofilme. Nestas condições, ocorrem mudanças no metabolismo das bactérias mais profundas na estrutura, gerando heterogeneidade da população e a presença de células persistentes, ou seja, células resistentes à ação dos antibióticos. Em adição, destaca-se a presença da matriz extracelular, que dificulta a penetração dos antimicrobianos, e a ação de enzimas que degradam antibióticos. Um mecanismo peculiar em *P. aeruginosa*, pode ser a produção de glucanas plásmicas que se liga aos antibióticos antes que eles atinjam seus alvos intracelulares (DE LA FUENTE-NÚÑEZ *et al.*, 2013).

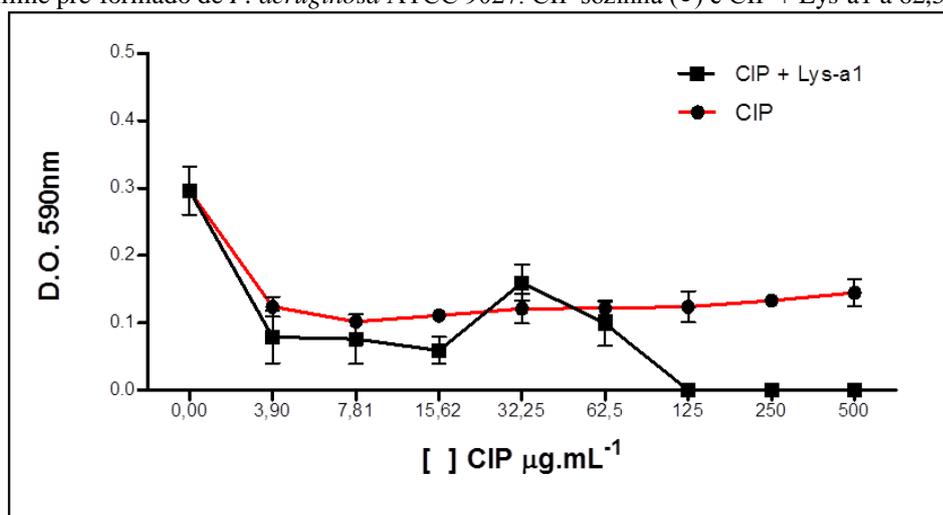
Pamp e colaboradores (2008), ao tratarem o biofilme de *P. aeruginosa* com o antibiótico CIP, observaram morte celular apenas nas subpopulações das camadas superiores onde estão as células metabolicamente ativas. No entanto, o tratamento combinado com a colistina foi capaz de erradicar as células do biofilme quase por completo. Esta impossibilidade de um antimicrobiano alcançar as bactérias no interior do biofilme também foi relatada por Tao e colaboradores (2011) para o AMP pleurocidin sobre o biofilme de micro-organismos cariogênicos.

Dessa forma, buscou-se uma concentração da CIP que, em combinação com a Lys-a1 fosse capaz de erradicar o biofilme de *P. aeruginosa*. Para isso, após a formação do biofilme por 12 h, o mesmo foi tratado com CIP, sozinha e combinada, em concentrações acima da CBM durante 5 h. Tais biofilmes foram analisados através da quantificação de biomassa através do método do CV e pela contagem das UFCs.

### **7.5.1 Quantificação de biomassa**

O biofilme de *P. aeruginosa* submetido ao tratamento com a CIP apresentou quantidade de biomassa menor em relação ao biofilme não tratado. Apesar da existência de biomassa residual formada nas 12 h iniciais de crescimento, pode-se concluir que o biofilme não foi capaz de continuar a se desenvolver após 5 h de contato com o antibiótico CIP em concentrações acima da CBM. Na presença da Lys-a1 esta redução se mostrou mais significativa, sendo verificada a diminuição total da biomassa a partir da concentração de 125  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  de CIP com 62,5  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  de Lys-a1 (Figura 18).

Figura 18 – Atividade antibacteriana da CIP em diferentes concentrações, sozinha e combinada com a Lys-a1, sobre o biofilme pré-formado de *P. aeruginosa* ATCC 9027. CIP sozinha (●) e CIP + Lys-a1 a 62,5  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  (■).



Fonte: Próprio autor.

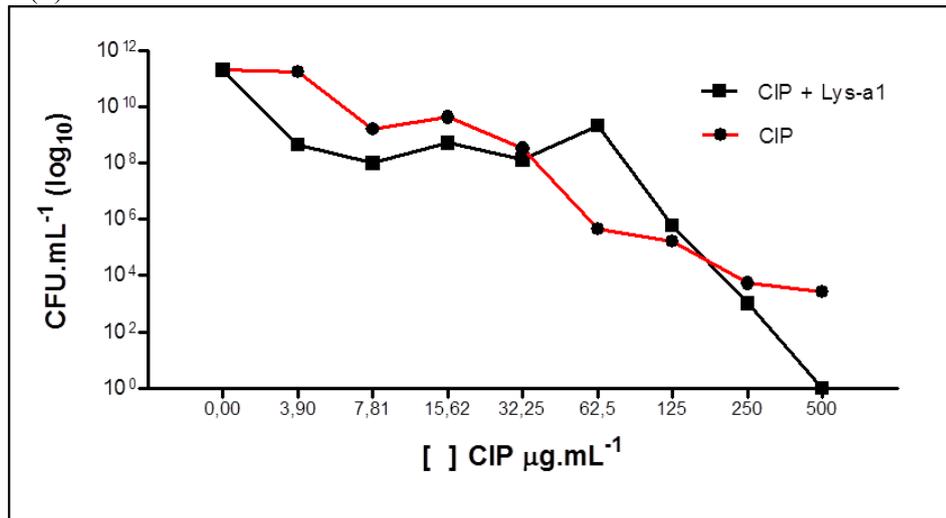
Resultado semelhante foi obtido por Kumar, Chhibber e Harjai (2013), quando estudaram a susceptibilidade do biofilme pré-formado de *P. aeruginosa* ao fito-químico zingerona sozinho e combinado com o antibiótico CIP. Neste estudo foi mostrada, através da coloração com CV, uma redução na formação da biomassa na presença das substâncias durante o período de 24 h, sobretudo na presença da CIP em combinação com o fito-químico.

O método de quantificação da biomassa pelo corante CV permite que não só a matriz extracelular seja marcada, mas também as células vivas e mortas presentes neste ambiente. Portanto, este método se torna inadequado para avaliar a morte de células do biofilme (LI; YAN e XU, 2003). Assim, procedeu-se com a contagem das UFC's com a finalidade de verificar se a biomassa residual detectada pelo CV é constituída por células viáveis ou apenas por substância polimérica extracelular e confirmar o efeito da CIP em combinação com a Lys-a1 na erradicação do biofilme de *P. aeruginosa*.

### 7.5.2 Contagem das Unidades Formadoras de Colônias (UFCs)

Pela contagem das UFCs verificou-se a presença de células viáveis na biomassa residual detectada pelo CV e nos poços com CIP a 125 e 250  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  combinada com Lys-a1, onde a biomassa estava ausente. Muito embora o biofilme de *P. aeruginosa* tenha se mostrado tolerante a CIM e CBM da CIP, houve uma diminuição dose dependente das UFCs pelo tratamento com concentrações acima da CBM. Todavia, a combinação com a Lys-a1 se mostrou mais eficiente na erradicação do biofilme, estabelecendo 100 % de redução das UFCs após 5 h de contato com 500  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  de CIP e 62,5  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  de Lys-a1 (Figura 19).

Figura 19 – Atividade antibacteriana da CIP em diferentes concentrações, sozinha e combinada com a Lys-a1, na viabilidade celular do biofilme pré-formado de *P. aeruginosa* ATCC 9027. CIP sozinha (●) e CIP + Lys-a1 a 62,5  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  (■).



Fonte: Próprio autor.

Trabalho similar a este foi realizado por Dosler e Mataraci (2013) ao investigarem a Concentração Mínima para a Erradicação de Biofilme (CMEB) do antibiótico CIP contra o biofilme *in vitro* de *S. aureus*. Estes autores mostraram que devido à resistência apresentada pelos biofilmes maduros, os valores de CMEB são superiores aos valores de CIM e que a relação CMEB/CIM é um dos parâmetros importantes para a seleção do antibiótico no tratamento de infecções associadas a biofilme. Além disso, mostraram interações sinérgicas e aditivas entre alguns AMPs e o antibiótico CIP, bem como a ação combinada destes contra o biofilme de *S. aureus*. Ressaltam ainda que, esta estratégia é potencialmente importante para o tratamento antibiofilme e para retardar o aparecimento de resistência antimicrobiana.

A tolerância inata do biofilme de *P. aeruginosa* tem sido superada pela associação entre antibióticos (MIKUNIYA *et al.*, 2007). Entretanto é necessária a busca por novas estratégias que potencializem a utilização, sobretudo, de menores doses dos agentes antimicrobianos. Nesta perspectiva, os AMPs aparecem como uma das classes de moléculas com grande potencial de aplicação contra o biofilme deste patógeno (SHARMA *et al.*, 2014).

Atualmente a terapia antibiofilme está baseada na interferência do sistema de quorum sensing, na inibição da adesão celular e no aumento da dispersão do biofilme (CHEN; WEN, 2011). Até a data, os mecanismos envolvidos na interação entre AMPs e antibióticos têm sido pouco investigados, sobretudo com relação à atividade antibiofilme. No entanto, tais interações constituem um importante campo a ser estudado a fim de proporcionar novas estratégias para a antibioticoterapia.

## *Capítulo 8 – Conclusão*

---

## 8 CONCLUSÃO

Considerando os resultados deste estudo, o peptídeo sintético Lys-a1 se mostra como um importante agente biotecnológico para a antibioticoterapia, no que se refere ao favorecimento da atividade antimicrobiana da CIP, podendo habilitar o uso de concentrações menores do antibiótico. Assim, estudos sobre a toxicidade e o perfil farmacocinético poderão indicar o uso deste peptídeo como agente terapêutico e adjuvante no tratamento de doenças infecciosas causadas por *P. aeruginosa*.

## *Referências bibliográficas*

---

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABEE, T.; KOVÁCS, Á. T.; KUIPERS, O. P.; VAN DER VEEN, S. Biofilm formation and dispersal in Gram-positive bacteria. **Current opinion in biotechnology**, v. 22, n. 2, p. 172-179, apr. 2011.
- AHMED, Z.; KHAN, S. S.; KHAN, M. *In vitro* trials of some antimicrobial combinations against *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 20, n. 1, p. 79-83, jan. 2013.
- ALLEGRUCCI, M., SAUER, K. Characterization of colony morphology variants isolated from *Streptococcus pneumoniae* biofilms. **Journal of Bacteriology**, v. 189, n. 5, p. 2030-2038, mar. 2007.
- ANDONOVA, M.; URUMOVA, V. Immune surveillance mechanisms of the skin against the stealth infection strategy of *Pseudomonas aeruginosa*. **Comparative immunology, microbiology and infectious diseases**, v. 36, n. 5, p. 433-448, sept. 2013.
- AZEVEDO, N. F.; CERCA, N. A matriz dos biofilmes: o truque para sobreviver nas mais hostis condições ambientais. In: AZEVEDO, N. F.; CERCA, N. (Org.). **Biofilmes: Na Saúde, no Ambiente, na Indústria**. Braga/Porto: Publindústria, 2012. cap. 2, p. 11-16.
- BABAUTA, J. T.; NGUYEN, H. D.; HARRINGTON, T. D.; RENSLOW, R.; BEYENAL, H. pH, redox potential and local biofilm potential microenvironments within *Geobacter sulfurreducens* biofilms and their roles in electron transfer. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 109, n. 10, p. 2651-2662, oct. 2012.
- BATONI, G.; MAISETTA, G.; BRANCATISANO, F. L.; ESIN, S.; CAMPA, M. Use of antimicrobial peptides against microbial biofilms: advantages and limits. **Current medicinal chemistry**, v. 18, n. 2, p. 256-279, june 2011.
- BENTO, J. C.; CERCA, N. O problema da resistência a antibióticos em biofilmes. In: AZEVEDO, N. F.; CERCA, N. (Org.). **Biofilmes: Na Saúde, no Ambiente, na Indústria**. Braga/Porto: Publindústria, 2012. cap. 20, p. 205-211.
- BERLANGA, M.; MONTERO, M. T.; HERNÁNDEZ-BORRELL, J.; VIÑAS, M. Influence of the cell wall on ciprofloxacin susceptibility in selected wild-type Gram-negative and Gram-positive bacteria. **International journal of antimicrobial agents**, v. 23, n. 6, p. 627-630, june 2004.
- BLANCHARD, B.; NURISSO, A.; HOLLVILLE, E.; TÉTAUD, C.; WIELS, J.; POKORNÁ, M.; WIMMEROVÁ, M.; VARROT, A.; IMBERTY, A. Structural basis of the preferential binding for globo-series glycosphingolipids displayed by *Pseudomonas aeruginosa* lectin I. **Journal of molecular biology**, v. 383, n. 4, p. 837-853, nov. 2008.
- BLEVES, S.; VIARRE, V.; SALACHA, R.; MICHEL, G. P.; FILLOUX, A.; VOULHOUX, R. Protein secretion systems in *Pseudomonas aeruginosa*: A wealth of pathogenic weapons. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 300, n. 8, p. 534-543, dec. 2010.

BOLINTINEANU, D. S.; VIVCHARUK, V.; KAZNESSIS, Y. N. Multiscale models of the antimicrobial Peptide protegrin-1 on gram-negative bacteria membranes. **International journal of molecular sciences**, v. 13, n. 9, p. 11000-11011, july 2012.

BOLON, M. K. The Newer Fluoroquinolones. **Medical Clinics of North America**, v. 95, n. 4, p. 793-817, July 2011.

BREIDENSTEIN, E. B. M.; DE LA FUENTE-NÚÑEZ, C.; HANCOCK, R. E. W. *Pseudomonas aeruginosa*: all roads lead to resistance. **Trends in microbiology**, v. 19, n. 8, p. 419-426, aug. 2011.

BROGDEN, K. A. Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? **Nature Reviews Microbiology**, v. 3, n. 3, p. 238-250, mar. 2005.

BYSTROVA, O. V.; KNIREL, Y. A.; LINDNER, B.; KOCHAROVA, N. A.; KONDAKOVA, A. N.; ZÄHRINGER, U.; PIER, G. B. Structures of the core oligosaccharide and O-units in the R-and SR-type lipopolysaccharides of reference strains of *Pseudomonas aeruginosa* O-sero groups. **FEMS Immunology & Medical Microbiology**, v. 46, n. 1, p. 85-99, feb. 2006.

CAI, Y.; WANG, R.; AN, M. M.; LIANG, B. B.; FANG, Y. *In vitro* bactericidal activity of allicin combined with cefoperazone, tobramycin and ciprofloxacin. **International journal of antimicrobial agents**, v. 31, n. 2, p. 179-180, feb. 2008.

CASTRO, M. S.; FERREIRA, T. C. G.; CILLI, E. M.; CRUSCA Jr, E.; MENDES-GIANNINI, M. J. S.; SEBEN, A.; RICART, C. A.; SOUSA, M. V.; FONTES, W. Hylin a1, the first cytolytic peptide isolated from the arboreal South American frog *Hypsiboas albolpunctatus* ("spotted treefrog"). **Peptides**, v. 30, n. 2, p. 291-296, feb. 2009.

CAZEDEY, E. C. L. **Análise químico-farmacêutica de cloridrato de ciprofloxacino em solução oftálmica**. 2009. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Araraquara, 2009.

CERCA, N.; JEFFERSON, K. K. Que vantagens têm os microrganismos em formar um biofilme? *In*: AZEVEDO, N. F.; CERCA, N. (Org.). **Biofilmes: Na Saúde, no Ambiente, na Indústria**. Braga/Porto: Publindústria, 2012. cap. 2, p. 11-16.

CHANG, W. S.; VAN DE MORTEL, M.; NIELSEN, L.; de GUZMAN, G. N.; LI, X.; HALVERSON, L. J. Alginate production by *Pseudomonas putida* creates a hydrated microenvironment and contributes to biofilm architecture and stress tolerance under water-limiting conditions. **Journal of bacteriology**, v. 189 n. 22, p. 8290-8299, nov. 2007.

CHÁVEZ DE PAZ, L. E. Development of a multispecies biofilm community by four root canal bacteria. **Journal of endodontics**, v. 38, n. 3, p. 318-323, mar. 2012.

CHEN, L. F.; CHOPRA, T.; KAYE, K. S. Pathogens resistant to antibacterial agents. **Infectious disease clinics of North America**, v. 95, n. 4, p. 647-676, july 2011.

CHEN, L.; WEN, Y. M. The role of bacterial biofilm in persistent infections and control strategies. **International journal of oral science**, v. 3, n. 2, p. 66-73, apr. 2011.

CHIEDA, Y.; IIYAMA, K.; LEE, J. M.; KUSAKABE, T.; YASUNAGA-AOKI, C.; SHIMIZU, S. Virulence of an exotoxin A-deficient strain of *Pseudomonas aeruginosa* toward the silkworm, *Bombyx mori*. **Microbial pathogenesis**, v. 51, n. 6, p. 407-414, dec. 2011.

CHOI, H.; LEE, D. G. Synergistic effect of antimicrobial peptide arenicin-1 in combination with antibiotics against pathogenic bacteria. **Research in microbiology**, v. 163, n. 6, p. 479-486, july 2012.

CIPROFLOXACINA: solução injetável. Responsável técnico Sônia Albano Badaró. Santo Amaro, SP: Billi Farmacêutica Ltda, 2013. Bula de remédio.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). **Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; approved standard – ninth edition, M07-A9**. Wayne, PA: CLSI; 2012.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). **Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: 23rd informational supplement (M100-S23)**. Wayne, PA: CLSI; 2013.

CONLON, J. M.; MECHKARSKA, M.; RADOSAVLJEVIC, G.; ATTOUB, S.; KING, J. D.; LUKIC, M. L.; MCCLEAN, S. A family of antimicrobial and immunomodulatory peptides related to the frenatins from skin secretions of the Orinoco lime frog *Sphaenorhynchus lacteus* (Hylidae). **Peptides**, v. 56, p. 132-140, june 2014.

CONRAD, J. C.; GIBIANSKY, M. L.; JIN, F.; GORDON, V. D.; MOTTO, D. A.; MATHEWSON, M. A.; STOPKA, W. G.; ZELASKO, D. C.; SHROUT, J. D.; WONG, G. C. L. Flagella and Pili-Mediated Near-Surface Single-Cell Motility Mechanisms in *P. aeruginosa*. **Biophysical journal**, v. 100, n. 7, p. 1608-1616, apr. 2011.

CORDERO, P.; CAVIGLIASSO, A.; PRÍNCIPE, A.; GODINO, A.; JOFRÉ, E.; MORI, G.; FISCHER, S. Genetic diversity and antifungal activity of native *Pseudomonas* isolated from maize plants grown in a central region of Argentina. **Systematic and applied microbiology**, v. 35, n. 5, p. 342-351, july 2012.

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, may 1999.

CRUSCA JR, E.; REZENDE, A. A.; MARCHETTO, R.; MENDES-GIANNINI, M. J. S.; FONTES, W.; CASTRO, M. S.; CILLI, E. M. Influence of N-Terminus modifications on the biological activity, membrane interaction, and secondary structure of the antimicrobial peptide Hylin-a1. **Biopolymers (Peptide Science)**, v. 96, n. 1, p. 41-48, 2011.

DAVEY, M. E.; O'TOOLE, G. A. Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics. **Microbiology and molecular biology reviews**, v. 64, n. 4, p. 847-867, dec. 2000.

DE LA FUENTE-NÚÑEZ, C.; REFFUVEILLE, F.; FERNÁNDEZ, L.; HANCOCK, R. E. Bacterial biofilm development as a multicellular adaptation: antibiotic resistance and new therapeutic strategies. **Current Opinion Microbiology**, v. 16, n. 5, p. 580-589, oct. 2013.

DELCOUR, A. H. Outer membrane permeability and antibiotic resistance. **Biochimica et Biophysica**, v. 1794, n. 5, p. 808-816, may 2009.

DORING, G.; CONWAY, S. P.; HEIJERMAN, H. G. M.; HODSON, M. E.; HOIBY, N.; SMYTH, A.; TOUW, D. J. Antibiotic therapy against *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis: a European consensus. **European Respiratory Journal**, v. 16, n. 4, p. 749-767, oct. 2000.

DOSLER, S.; MATARACI, E. *In vitro* pharmacokinetics of antimicrobial cationic peptides alone and in combination with antibiotics against methicillin resistant *Staphylococcus aureus* biofilms. **Peptides**, v. 49, p. 53-58, nov. 2013.

DUNNE, W. M. Bacterial adhesion: seen any good biofilms lately? **Clinical microbiology reviews**, v. 15, n. 2, p. 155-166, apr. 2002.

ERNST, R. K.; HAJJAR, A. M.; TSAI, J. H.; MOSKOWITZ, S. M.; WILSON, C. B.; MILLER, S. I. *Pseudomonas aeruginosa* lipid A diversity and its recognition by Toll-like receptor 4. **Journal of endotoxin research**, v. 9, n. 6, p. 395-400, 2003.

FELDMAN, M.; BRYAN, R.; RAJAN, S.; SCHEFFLER, L.; BRUNNERT, S.; TANG, H.; PRINCE, A. Role of flagella in pathogenesis of *Pseudomonas aeruginosa* pulmonary infection. **Infection and immunity**, v. 66, n. 1, p. 43-51, jan. 1998.

FERNANDES, F.; NEVES, P.; GAMEIRO, P.; LOURA, L. M. S.; PRIETO, M. Ciprofloxacin interactions with bacterial protein OmpF: modelling of FRET from a multi-tryptophan protein trimer. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes**, v. 1768, n. 11, p. 2822-2830, nov. 2007.

FERNÁNDEZ, L., BREIDENSTEIN, E. B. M.; HANCOCK, R. E. W. Creeping baselines and adaptive resistance to antibiotics. **Drug Resistance Updates**, v. 14, n. 1, p. 1-21, feb. 2011.

FERNÁNDEZ-OLMOS, A.; GARCÍA-CASTILLO, M.; MAIZ, L.; LAMAS, A.; BAQUERO, F.; CANTÓN R. *In vitro* prevention of *Pseudomonas aeruginosa* early biofilm formation with antibiotics used in cystic fibrosis patients. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 40, n 2, p. 173-176, aug. 2012.

FLEMMING, H. C.; WINGENDER, J. The biofilm matrix. **Nature Reviews Microbiology**, v. 8, n. 9, p. 623-633, sept. 2010.

GALLOWAY, W. R. J. D.; HODGKINSON, J. T.; BOWDEN, S.; WELCH, M.; SPRING, D. R. Applications of small molecule activators and inhibitors of quorum sensing in Gram-negative bacteria. **Trends in microbiology**, v. 20, n. 9, p. 449-458, sept. 2012.

GERLACH, R. G.; HENSEL, M. Protein secretion systems and adhesins: the molecular armory of Gram-negative pathogens. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 297, n. 6, p. 401-415, oct. 2007.

GIRARDI, C.; GREVE, J.; LAMSHÖFT, M.; FETZER, I.; MILTNER, A.; SCHÄFFER, A.; KÄSTNER, M. Biodegradation of ciprofloxacin in water and soil and its effects on the microbial communities. **Journal of hazardous materials**, v. 198, p. 22-30, dec. 2011.

GUPTA, G.; PANWAR, J.; JHA, P. N. Natural occurrence of *Pseudomonas aeruginosa*, a dominant cultivable diazotrophic endophytic bacterium colonizing *Pennisetum glaucum* (L.) R. Br. **Applied Soil Ecology**, v. 64, p. 252-261, feb. 2013.

HAMMOND, A.; DERTIEN, J.; COLMER-HAMOOD, J. A.; GRISWOLD, J. A.; HAMOOD, A. N. Serum Inhibits *P. aeruginosa* Biofilm Formation on Plastic Surfaces and Intravenous Catheters. **Journal of Surgical Research**, v. 159, n. 2, p. 735-746, apr. 2010.

HAMOUD, R.; ZIMMERMANN, S.; REICHLING, J.; WINK, M. Synergistic interactions in two-drug and three-drug combinations (thymol, EDTA and vancomycin) against multi drug resistant bacteria including *E. coli*. **Phytomedicine**, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.phymed.2013.10.016>>. Acesso em: 15 mar. 2014.

HASSETT, D. J.; CUPPOLETTI, J.; TRAPNELL, B.; LYMAR, S. V.; ROWE, J. J.; SUN YOON, S.; HILLIARD, G. M.; PARVATIYAR, K.; KAMANI, M. C.; WOZNIAK, D. J.; HWANG, S. H.; MCDERMOTT, T. R.; OCHSNER, U. A. Anaerobic metabolism and quorum sensing by *Pseudomonas aeruginosa* biofilms in chronically infected cystic fibrosis airways: rethinking antibiotic treatment strategies and drug targets. **Advanced drug delivery reviews**, v. 54, n. 11, p. 1425-1443, dec. 2002.

HAY, I. D.; GATLAND, K.; CAMPISANO, A.; JORDENS, J. Z.; REHM, B. H. A. Impact of alginate overproduction on attachment and biofilm architecture of a supermucoic *Pseudomonas aeruginosa* strain. **Applied and environmental microbiology**, v. 75, n.18, p. 6022-6025, sept. 2009.

HE, J.; ANDERSON, M. H.; SHI, W.; ECKERT, R. Design and activity of a 'dual-targeted' antimicrobial peptide. **Int J Antimicrob Agents**, v. 33, n. 6, p. 532-537, june 2009.

HELT, C. D.; WEBER, K. P.; LEGGE, R. L.; SLAWSON, R. M. Antibiotic resistance profiles of representative wetland bacteria and faecal indicators following ciprofloxacin exposure in lab-scale constructed mesocosms. **Ecological Engineering**, v. 39, p. 113-122, feb. 2012.

HENRIQUE, A.; VASCONCELOS, C.; CERCA, N. Prevalência de biofilmes nosocomiais em Portugal e no Brasil. In: AZEVEDO, N. F.; CERCA, N. (Org.). **Biofilmes: Na Saúde, no Ambiente, na Indústria**. Braga/Porto: Publindústria, 2012. cap. 5, p. 29-36.

HODGES, N. A.; GORDON, C. A. Protection of *Pseudomonas aeruginosa* against ciprofloxacin and beta-lactams by homologous alginate. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 35, n. 11, p. 2450-2452, nov. 1991.

HOLLAND, S. J.; SANZ, C.; PERHAM, R. N. Identification and specificity of pilus adsorption proteins of filamentous bacteriophages infecting *Pseudomonas aeruginosa*. **Virology**, v. 345, n. 2, p. 540-548, feb. 2006.

HOOPER, D. C. Emerging mechanisms of fluoroquinolone resistance. **Emerging infectious diseases**, v. 7, n. 2, p. 337-341, mar.-apr. 2001.

HORNEF, M. W.; ROGGENKAMP, A.; GEIGER, A. M.; HOGARDT, M.; JACOBI, C. A.; HEESEMANN, J. Triggering the ExoS regulon of *Pseudomonas aeruginosa*: A GFP-reporter analysis of exoenzyme (Exo) S, ExoT and ExoU synthesis. **Microbial pathogenesis**, v. 29, n. 6, p. 329-343, dec. 2000.

HUA, J.; SCOTT, R. W.; DIAMOND, G. Activity of antimicrobial peptide mimetics in the oral cavity: II. Activity against periopathogenic biofilms and anti-inflammatory activity. **Molecular Oral Microbiology**, v. 25, n. 6, p. 426-432, dez. 2010.

HUNT, S. M.; WERNER, E. M.; HUANG, B.; HAMILTON, M. A.; STEWART, P. S. Hypothesis for the role of nutrient starvation in biofilm detachment. **Applied and environmental microbiology**, v. 70, n. 12, p. 7418-7425, dec. 2004.

JAYARAMAN, P.; SAKHARKAR, M. K.; LIM, C. S.; TANG, T. H.; SAKHARKAR, K. R. Activity and interactions of antibiotic and phytochemical combinations against *Pseudomonas aeruginosa* in vitro. **International journal of biological sciences**, v. 6, n. 6, p. 556-568, sept. 2010.

JEFFERSON, K. K. What drives bacteria to produce a biofilm? **FEMS microbiology letters**, v. 236, n. 2, p. 163-173, june 2004.

JENSEN, P. Ø.; BJARNSHOLT, T.; PHIPPS, R.; RASMUSSEN, T. B.; CALUM, H.; CHRISTOFFERSEN, L.; MOSER, C.; WILLIAMS, P.; PRESSLER, T.; GIVSKOV, M.; HØIBY, N. Rapid necrotic killing of polymorphonuclear leukocytes is caused by quorum-sensing-controlled production of rhamnolipid by *Pseudomonas aeruginosa*. **Microbiology**, v. 153, n. 5, p. 1329-1338, may 2007.

JONES, R. N.; ANDEREGG, T. R.; DESHPANDE, L. M. AZD2563, a new oxazolidinone bactericidal activity and synergy studies combined with gentamicina or vancomycin against staphylococci and streptococcal stains. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 43, n. 1, p. 87-90, may 2002.

JOO, H. S.; OTTO, M. Molecular basis of *in vivo* biofilm formation by bacterial pathogens. **Chemistry & biology**, v. 19, n. 12, p. 1503-1513, dec. 2012.

KATAOKA, H.; IDA, T.; ISHII, Y.; TATEDA, K.; OGURI, T.; YOSHIDA, A.; OKUZUMI, K.; OISHI, T.; TSUKAHARA, M.; MORI, S.; YONEYAMA, A.; ARAOKA, H.; MITSUDA, T.; SUMITOMO, M.; MORIYA, K.; GOTO, M.; NAKAMORI, Y.; SHIBAYAMA, A.; OHMAGARI, N.; SATO, T.; YAMAGUCHI, K. Analysis of the influence of drug resistance factors on the efficacy of combinations of antibiotics for multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolated from hospitals located in the suburbs of Kanto area, Japan. **Journal of Global Antimicrobial Resistance**, v. 1, n. 2, p. 91-96, june 2013.

KERR, K. G.; SNELLING, A. M. *Pseudomonas aeruginosa*: a formidable and ever-present adversary. **Journal of Hospital Infection**, v. 73, n. 4, p. 338-344, dec. 2009.

KIM, Y. J.; PAEK, S. H.; JIN, S.; PARK, B. S.; HA, U. H. A novel *Pseudomonas aeruginosa* derived effector cooperates with flagella to mediate the upregulation of interleukin 8 in human epithelial cells. **Microbial pathogenesis**, v. 66, p. 24-28, jan. 2014.

KOHANSKI, M. A.; DWYER, D. J.; COLLINS, J. J. How antibiotics kill bacteria: from targets to networks. **Nature Reviews Microbiology**, v. 8, n. 6, p. 423-435, june 2010.

KOLEY, D.; RAMSEY, M. M.; BARD, A. J.; WHITELEY, M. Discovery of a biofilm electrocline using real-time 3D metabolite analysis. **Proceedings of the National Academy of Science**, v. 108, n. 50, p. 19996-20001, dez. 2011.

KOMORI, Y.; NONOGAKI, T.; NIKAI, T. Hemorrhagic activity and muscle damaging effect of *Pseudomonas aeruginosa* metalloproteinase (elastase). **Toxicon**, v. 39, n. 9, p. 1327-1332, sept. 2001.

KUMAR, A.; SCHWEIZER, H. P. Bacterial resistance to antibiotics: active efflux and reduced uptake. **Advanced drug delivery reviews**, v. 57, n. 10, p. 1486-1513, july 2005.

KUMAR, L.; CHHIBBER, S.; HARJAI, K. Zingerone inhibit biofilm formation and improve antibiofilm efficacy of ciprofloxacin against *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. **Fitoterapia**, v. 90, p. 73-78, oct. 2013.

KUMAR, S.; KUNDU, S.; PAKSHIRAJAN, K.; DASU, V. V. Cephalosporins determination with a novel microbial biosensor based on permeabilized *Pseudomonas aeruginosa* whole cells. **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 151, n. 2-3, p. 653-664, dec. 2008.

LEE, J. K.; PARK, S. C.; HAHM, K. S.; PARK, Y. Antimicrobial HPA3NT3 peptide analogs: Placement of aromatic rings and positive charges are key determinants for cell selectivity and mechanism of action. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes**, v. 1828, n. 2, p. 443-454, feb. 2013.

LEE, Y. J.; LIU, H. Y.; LIN, Y. C.; SUN, K. L.; CHUN, C. L.; HSUEH, P. R. Fluoroquinolone resistance of *Pseudomonas aeruginosa* isolates causing nosocomial infection is correlated with levofloxacin but not ciprofloxacin use. **International journal of antimicrobial agents**, v. 35, n. 3, p. 261-264, mar. 2010.

LEID, J. G.; WILLSON, C. J.; SHIRTLIFF, M. E.; HASSETT, D. J.; PARSEK, M. R.; JEFFERS, A. K. The exopolysaccharide alginate protects *Pseudomonas aeruginosa* biofilm bacteria from IFN- $\gamma$ -mediated macrophage killing. **The Journal of Immunology**, v. 175, n. 11, p. 7512-7518, dec. 2005.

LEWIS, R. E.; DIEKEMA, D. J.; MESSER, S. A.; PFALLER, M. A.; KLEPSEK, M. E. Comparison of Etest, checkerboard dilution and time-kill studies for the detection of synergy or antagonism between antifungal agents tested against *Candida* species. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 49, n.2, p. 345-351, feb. 2002.

LI, J.; SHIMIZU, K.; MASEDA, H.; LU, Z.; UTSUMI, M.; ZHANG, Z.; SUGIURA, N. Investigations into the biodegradation of microcystin-LR mediated by the biofilm in wintertime from a biological treatment facility in a drinking-water treatment plant. **Bioresource technology**, v. 106, p. 27-35, fev. 2012a.

LILLEHOJ, E. P.; KIM, B. T.; KIM, K. C. Identification of *Pseudomonas aeruginosa* flagellin as an adhesin for Muc1 mucin. **American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology**, v. 282, n. 4, p. 751-756, apr. 2002.

LI, L. N.; GUO, L. H.; LUX, R.; ECKERT, R.; YARBROUGH, D.; HE, J.; ANDERSON, M.; SHI, W. Y. Targeted antimicrobial therapy against *Streptococcus mutans* establishes protective non-cariogenic oral biofilms and reduces subsequent infection. **International journal of oral science**, v. 2, n. 2, p. 66-73, june 2010b.

LIN, H.; ZHANG, M.; WANG, F.; MENG, F.; LIAO, B. Q.; HONG, H.; CHEN, J.; GAO, W. A critical review of extracellular polymeric substances (EPSs) in membrane bioreactors: Characteristics, roles in membrane fouling and control strategies. **Journal of Membrane Science**, v. 460, p. 110-125, june 2014.

LIU, Y.; WANG, L.; ZHOU, X.; HU, S.; ZHANG, S.; WU, H. Effect of the antimicrobial decapeptide KSL on the growth of oral pathogens and *Streptococcus mutans* biofilm. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 37, n. 1, p. 33-38, jan. 2011.

LI, X.; NIELSEN, L.; NOLAN, C.; HALVERSON, L. J. Transient alginate gene expression by *Pseudomonas putida* biofilm residents under water-limiting conditions reflects adaptation to the local environment. **Environmental microbiology**, v. 12, n. 6, p. 1578-1590, june 2010a.

LI, X.; YAN, Z.; XU, J. Quantitative variation of biofilms among strains in natural populations of *Candida albicans*. **Microbiology**, v. 149, n. 2, p. 353-362, feb. 2003.

LI, Y. H.; TIAN, X. Quorum sensing and bacterial social interactions in biofilms. **Sensors**, v. 12, n. 3, p. 2519-2538, jan. 2012.

LI, Y.; XIANG, Q.; ZHANG, Q.; HUANG, Y.; SU, Z. Overview on the recent study of antimicrobial peptides: origins, functions, relative mechanisms and application. **Peptides**, v. 37, n. 2, p. 207-215, oct. 2012b.

LLANES, C.; KÖHLER, T.; PATRY, I.; DEHECQ, B.; VAN DELDEN, C.; PLÉSIAT, P. Role of the MexEF-OprN efflux system in low-level resistance of *Pseudomonas aeruginosa* to ciprofloxacin. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 55, n. 12, p. 5676-5684, dec. 2011.

LOPES, S.; AZEVEDO, N. F.; PEREIRA, M. O. Impacto dos biofilmes na fibrose cística. In: AZEVEDO, N. F.; CERCA, N. (Org.). **Biofilmes: Na Saúde, no Ambiente, na Indústria**. Braga/Porto: Publindústria, 2012. cap. 7, p. 45-57.

LÓPEZ, D. J.; COLLADO, M. I.; IBARGUREN, M.; VASIL, A. I.; VASIL, M. L.; GOÑI, F. M.; ALONSO, A. Multiple phospholipid substrates of phospholipase C/sphingomyelinase

HR<sub>2</sub> from *Pseudomonas aeruginosa*. **Chemistry and physics of lipids**, v. 164, n. 1, p. 78-82, jan. 2011.

LOURENÇO, T.; CERCA, N.; AZEVEDO, N. F. Biofilmes em cateteres urinários. *In*: AZEVEDO, N. F.; CERCA, N. (Org.). **Biofilmes**: Na Saúde, no Ambiente, na Indústria. Braga/Porto: Pubblindústria, 2012. cap. 8, p. 59-69.

MAI, G. T.; MCCORMACK, J. G.; SEOW, W. K.; PIER, G. B.; JACKSON, L. A.; THONG, Y. H. Inhibition of adherence of mucoid *Pseudomonas aeruginosa* by alginase, specific monoclonal antibodies, and antibiotics. **Infection and immunity**, v. 61, n. 10, p. 4338-4343, oct. 1993.

MANAFI, A.; KOHANTEB, J.; MEHRABANI, D.; JAPONI, A.; AMINI, M.; NAGHMACHI, M.; ZAGHI A. H. KHALILI, N. Active immunization using exotoxin A confers protection against *Pseudomonas aeruginosa* infection in a mouse burn model. **BMC microbiology**, v. 9, n. 23, feb. 2009.

MARR, A. K.; MCGWIRE, B. S.; MCMASTER, W. R. Modes of action of Leishmanicidal antimicrobial peptides. **Future Microbiology**, v. 7, n. 9, p. 1047-1059, sept. 2012.

MARSH, P.; MARTIN, M. V. **Microbiologia Oral**. 4. ed. São Paulo: Livraria Santos Editora, 2005.

MARTI, E.; HUERTA, B.; RODRÍGUEZ-MOZAZ, S.; BARCELÓ, D.; JOFRE, J.; BALCÁZAR, J. L. Characterization of ciprofloxacin-resistant isolates from a wastewater treatment plant and its receiving river. **Water Research**, v. 61, p. 67-76, may 2014.

MAVRODI, D. V.; BLANKENFELDT, W.; THOMASHOW, L. S. Phenazine Compounds in Fluorescent *Pseudomonas* Spp. Biosynthesis and Regulation\*. **Annual Reviews Phytopathol**, v. 44, p. 417-445, may 2006.

MCLEAN, J. S.; MAJORS, P. D.; REARDON, C. L.; BILSKIS, C. L.; REED, S. B.; ROMINE, M. F.; FREDRICKSON, J. K. Investigations of structure and metabolism within *Shewanella oneidensis* MR-1 biofilms. **Journal of microbiological methods**, v. 74, n. 1, p. 47-56, july 2008.

MEESTERS, K. P. H.; VAN GROENESTIJN, J. W.; GERRITSE, J. Biofouling reduction in recirculating cooling systems through biofiltration of process water. **Water Research**, v. 37, n. 3, p. 525-532, fev. 2003.

MIKUNIYA, T.; KATO, Y.; IDA, T.; MAEBASHI, K.; MONDEN, K.; KARIYAMA, R.; KUMON, H. Treatment of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms with a combination of fluoroquinolones and fosfomicin in a rat urinary tract infection model. **Journal of Infection and Chemotherapy**, v. 13, n. 5, p. 285-290, oct. 2007.

MIN, C.; OHTA, K.; KAJIYA, M.; ZHU, T.; SHARMA, K.; SHIN, J.; MAWARDI, H.; HOWAIT, M.; HIRSCHFELD, J.; BAHAMMAM, L.; ICHIMONJI, I.; GANTA, S.; AMIJI, M.; KAWAI, T. The antimicrobial activity of the appetite peptide hormone ghrelin. **Peptides**, v. 36, n. 2, p. 151-156, aug. 2012.

MORITA, Y.; TOMIDA, J.; KAWAMURA, Y. Responses of *Pseudomonas aeruginosa* to antimicrobials. **Frontiers in microbiology**, v. 4, p. 1-8, jan. 2014.

MOSSIALOS, D.; AMOUTZIAS, G. D. Siderophores in fluorescent pseudomonads: new tricks from an old dog. **Future Microbiol**, v. 2, n. 4, p. 387-95, aug. 2007.

MULLER, M. Pyocyanin induces oxidative stress in human endothelial cells and modulates the glutathione redox cycle. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 33, n. 11, p. 1527-1533, dec. 2002.

MURRAY, P. R.; ROSENTHAL, K. S.; KOBAYASHI, G. S.; PFALLER, M. A. **Microbiologia Médica**. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004.

NAGANT, C., TRÉ-HARDY, M., DEVLEESCHOUWER, M.; DEHAYE, J. P. Study of the initial phase of biofilm formation using a biofomic approach. **Journal of microbiological methods**, v. 82, n. 3, p. 243-248, sept. 2010.

NAKAMURA, I.; YAMAGUCHI, T.; TSUKIMORI, A.; SATO, A.; FUKUSHIMA, S.; MIZUNO, Y.; MATSUMOTO, T. Effectiveness of antibiotic combination therapy as evaluated by the Break-point Checkerboard Plate method for multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in clinical use. **Journal of Infect.on and Chemotherapy**, v. 20, n. 4, p 266-269, apr. 2014.

NAKATSUJI, T.; GALLO, R. L. Antimicrobial peptides: old molecules with new ideas. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 132, n. 3, p. 887-895, mar. 2012.

NEVES, P. R.; MAMIZUKA, E. M.; LEVY, C. E.; LINCOPAN, N. *Pseudomonas aeruginosa* multirresistente: um problema endêmico no Brasil. **J Bras Patol Med Lab**, v. 47, n. 4, p. 409-420, ago. 2011.

NGUYEN, D.; JOSHI-DATAR, A.; LEPINE, F.; BAUERLE, E.; OLAKANMI, O.; BEER, K.; MCKAY, G.; SIEHNEL, R.; SCHAFHAUSER, J.; WANG, Y.; BRITIGAN, B. E.; SINGH, P. K. Active starvation responses mediate antibiotic tolerance in biofilms and nutrient-limited bacteria. **Science**, v. 334, n. 6058, p. 982-986, nov. 2011.

NIVENS, D. E.; OHMAN, D. E.; WILLIAMS, J.; FRANKLIN, M. J. Role of alginate and its O acetylation in formation of *Pseudomonas aeruginosa* microcolonies and biofilms. **Journal of bacteriology**, v. 183, n. 3, p. 1047-1057, feb. 2001.

OKUDA, T.; OKUDA, K.; KOKUBU, E.; KAWANA, T.; SAITO, A.; ISHIHARA, K.. Synergistic effect on biofilm formationa between *Fusobacterium nucleatum* and *Capnocytophaga ochracea*. **Anaerobe**, v. 18, n. 1, p. 157-161, fev. 2012.

O'TOOLE G. A., KOLTER R. Initiation of biofilm formation in *Pseudomonas fluorescens* WCS365 proceeds via multiple, convergent signalling pathways: a genetic analysis. **Molecular Microbiology**, v. 28, n. 3, p. 449-461, may 1998.

PAMP, S. J.; GJERMANSSEN, M.; JOHANSEN, H. K.; TOLKER-NIELSEN, T. Tolerance to the antimicrobial peptide colistin in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms is linked to

metabolically active cells, and depends on the *pmr* and *mexAB-oprM* genes. **Molecular Microbiology**, v. 68, n. 1, p. 223-240, apr. 2008.

PAMP, S. J.; TOLKER-NIELSEN, T. Multiple roles of biosurfactants in structural biofilm development by *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of bacteriology**, v. 189, n. 6, p. 2531-2539, mar. 2007.

PASUPULETI, M.; CHALUPKA, A.; MÖRGELIN, M.; SCHMIDTCHEN, A.; MALMSTEN, M. Tryptophan end-tagging of antimicrobial peptides for increased potency against *Pseudomonas aeruginosa*. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects**, v. 1790, n. 8, p. 800-808, aug. 2009.

PAULSEN, V. S.; BLENCCKE, H. M.; BENINCASA, M.; HAUG, T.; EKSTEEN, J. J.; STYRVOLD, O. B.; SCOCCHI, M.; STENSVÅG, K. Structure-activity relationships of the antimicrobial Peptide arasin 1 - and mode of action studies of the N-terminal, proline-rich region. **PLoS One**, v. 8, n. 1, p. 526-533, jan. 2013.

PEIX, A.; RAMÍREZ-BAHENA, M. H.; VELÁZQUEZ, E. Historical evolution and current status of the taxonomy of genus *Pseudomonas*. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 9, n. 6, p. 1132-1147, dec. 2009.

PETROVA, O. E.; SAUER, K. Sticky situations: key components that control bacterial surface attachment. **Journal of bacteriology**, v. 194, n. 10, p. 2413-2425, may. 2012.

POOLE, K. Aminoglycoside resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 49, n. 2, p. 479-487, feb. 2005.

QIAN, F.; WU, Y.; MURATOVA, O.; ZHOU, H.; DOBRESCU, G.; DUGGAN, P.; LYNN, L.; SONG, G.; ZHANG, Y.; REITER, K.; MACDONALD, N.; NARUM, D. L.; LONG, C. A.; MILLER, L. H.; SAUL, A. MULLEN, G. E. D. Conjugating recombinant proteins to *Pseudomonas aeruginosa* ExoProtein A: A strategy for enhancing immunogenicity of malaria vaccine candidates. **Vaccine**, v. 25, n. 20, p. 3923-3933, may 2007.

RAHAL, J. J. Novel antibiotic combinations against infections with almost completely resistant *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter species*. **Clinical infectious diseases**, v. 43, (Supplement 2), S95-S99, sept. 2006.

RAMIREZ, M. S.; TOLMASKY, M. E. Aminoglycoside modifying enzymes. **Drug Resistance Updates**, v. 13, n. 6, p. 151-171, dec. 2010.

RANG, H. P.; DALE, M. M.; RITTER, I. M.; FLOWER, R. J. **Farmacologia**. 6. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2007.

RASUL, R.; COLE, N.; BALASUBRAMANIAN, D.; CHEN, R.; KUMAR, N.; WILLCOX, M. D. P. Interaction of the antimicrobial peptide melimine with bacterial membranes. **International journal of antimicrobial agents**, v. 35, n. 6, p. 566-572, june. 2010.

REIS, R. S.; PEREIRA, A. G.; NEVES, B. C.; FREIRE, D. M.G. Gene regulation of rhamnolipid production in *Pseudomonas aeruginosa* – A review. **Bioresource Technology**, v. 102, n.11, p. 6377–6384, june 2011.

REMMINGHORST, U.; REHM, B. H. Bacterial alginates: from biosynthesis to applications. **Biotechnology letters**, v. 28, n. 21, p. 1701-1712, aug. 2006.

RICKARD, A. H.; GILBERT, P.; HIGH, N. J.; KOLENBRANDER, P. E.; HANDLEY, P. S. Bacterial coaggregation: an integral process in the development of multi-species biofilms. **Trends Microbiol.**, v. 11, n. 2, p. 94-100, feb. 2003.

RICKARD, A. H.; PALMER JR, R. J.; BLEHERT, D. S.; CAMPAGNA, S. R.; SEMMELHACK, M. F.; EGLAND, P. G.; BASSLER, B. L.; KOLENBRANDER, P. E. Autoinducer 2: a concentration-dependent signal for mutualistic bacterial biofilm growth. **Molecular Microbiology**, v. 60, n. 6, p. 1446-1456, june 2006.

ROCHEX, A.; LEBEAULT, J. M. Effects of nutrients on biofilm formation and detachment of a *Pseudomonas putida* strain isolated from a paper machine. **Water research**, v. 41, n. 13, p. 2885-2892, july 2007.

RYDER, C.; BYRD, M.; WOZNIAK, D. J. Role of polysaccharides in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. **Current opinion in microbiology**, v. 10, n. 6, p. 644-648, dec. 2007.

SALWICZEK, M.; QU, Y.; GARDINER, J.; STRUGNELL, R. A.; LITHGOW, T.; MCLEAN, K. M.; THISSEN, H. Emerging rules for effective antimicrobial coatings. **Trends in biotechnology**, v. 32, n. 2, p. 82-90, feb. 2014.

SAUER, K.; CULLEN, M. C.; RICKARD, A. H.; ZEEF, L. A. H.; DAVIES, D. G.; GILBERT, P. Characterization of nutrient-induced dispersion in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 biofilm. **Journal of bacteriology**, v. 186, n. 21, p. 7312-7326, nov. 2004.

SCHUSTER, M.; LOSTROH, C. P.; OGI, T.; GREENBERG, E. P. Identification, timing, and signal specificity of *Pseudomonas aeruginosa* quorum-controlled genes: a transcriptome analysis. **Journal of bacteriology**, v. 185, n. 7, p. 2066-2079, apr. 2003.

SHALEV, D. E.; MOR, A.; KUSTANOVICH, I. Structural consequences of carboxyamidation of dermaseptin S3. **Biochemistry**, v. 41, n. 23, p. 7312-7317, june 2002.

SHARMA, G.; RAO, S.; BANSAL, A.; DANG, S.; GUPTA, S.; GABRANI, R. *Pseudomonas aeruginosa* biofilm: Potential therapeutic targets. **Biologicals**, v. 42, n. 1, p. 1-7, jan. 2014.

SHENG, G. P.; YU, H. Q.; LI, X. Y. Extracellular polymeric substances (EPS) of microbial aggregates in biological wastewater treatment systems: a review. **Biotechnology Advances**, v. 28, n. 6, p. 882-894, nov.-dec. 2010.

SILVA, B. R.; FREITAS, V. A. A.; CARNEIRO, V. A.; ARRUDA, F. V. S.; LORENZÓN, E. N.; AGUIAR, A. S. W.; CILLI, E. M.; CAVADA, B. S.; TEIXEIRA, E. H. Antimicrobial

activity of the synthetic peptide Lys-a1 against oral streptococci. **Peptides**, v. 42, p. 78-83, apr. 2013.

SILVA, B. R.; FREITAS, V. A. A.; NASCIMENTO-NETO, L. G.; CARNEIRO, V. A.; ARRUDA, F. V. S.; AGUIAR, A. S. W.; CAVADA, B. S.; TEIXEIRA, E. H. Antimicrobial peptide control of pathogenic microorganisms of the oral cavity: A review of the literature. **Peptides**, v. 36, n. 2, p. 315-321, ago. 2012.

SILVERMAN, R. J.; NOBBS, A. H.; VICKERMAN, M. M.; BARBOUR, M. E.; JENKINSON, H. F. Interaction of *Candida albicans* cell wall Als3 protein with *Streptococcus gordonii* SspB adhesin promotes development of Mixed-Species communities. **Infection and Immunity**, v. 78, n. 11, p. 4644-4652, nov. 2010.

SOARES, M. C. S. T. **Estudo de resistência aos antimicrobianos em amostras de *Pseudomonas aeruginosa* isoladas em hospitais da cidade de Niterói-RJ.** (2005). Dissertação (Mestrado em Patologia Experimental) – Curso de Pós-graduação em Patologia, Universidade Federal Fluminense, Rio de Janeiro, 2005.

SREY, S.; JAHID, I. K.; HA, S. D. Biofilm formation in food industries: A food safety concern. **Food Control**, v. 31, n. 2, p. 572-585, june 2013.

SUN, F.; QU, F.; LING, Y.; MAO, P.; XIA, P.; CHEN, H.; ZHOU, D. Biofilm-associated infections: antibiotic resistance and novel therapeutic strategies. **Future microbiology**, v. 8, n. 7, p. 877-886, july 2013.

TAO, R.; TONG, Z.; LIN, Y.; XUE, Y.; WANG, W.; KUANG, R.; WANG, P.; TIAN, Y.; NI, L. Antimicrobial and antibiofilm activity of pleurocidin against cariogenic microorganisms. **Peptides**, v. 32, n. 8, p. 1748-1754, aug. 2011.

TATEDA, K.; ISHII, Y.; MATSUMOTO, T.; YAMAGUCHI, K. 'Break-point Checkerboard Plate' for screening of appropriate antibiotic combinations against multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. **Scandinavian journal of infectious diseases**, v. 38, n. 4, p. 268-272, jan. 2006.

TEIXEIRA, V.; FEIO, M. J.; BASTOS, M. Role of lipids in the interaction of antimicrobial peptides with membranes. **Progress in lipid research**, v. 51, n. 2, p. 149-177, abr. 2012.

THOMAS, S. J.; THANIGAIVEL, S.; VIJAYAKUMAR, S.; ACHARYA, K.; SHINGE, D.; SEELAN, T. S. J.; MUKHERJEE, A.; CHANDRASEKARAN, N. Pathogenicity of *Pseudomonas aeruginosa* in *Oreochromis mossambicus* and treatment using lime oil nanoemulsion. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 116, p. 372-377, apr. 2014.

TORCATO, I. M.; HUANG, Y. H.; FRANQUELIM, H. G.; GASPAR, D.; CRAIK, D. J.; CASTANHO, M. A. R. B.; TROEIRA HENRIQUES, S. Design and characterization of novel antimicrobial peptides, R-BP100 and RW-BP100, with activity against Gram-negative and Gram-positive bacteria. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes**, v. 1828, n. 3, p. 944-955, mar. 2013.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. 10. ed. Porto Alegre: Artmed, 2012.

TRIPATHI, P.; BEAUSSART, A.; ANDRE, G.; ROLAIN, T.; LEBEER, S.; VANDERLEYDEN, J.; HOLS, P.; DUFRÊNE, Y. F. Towards a nanoscale view of lactic acid bacteria. **Micron**, v. 43, n. 12, p. 1323-1330, dec. 2012.

WALKER, J. T., JHUTTY, A., PARKS, S., WILLIS, C., COPLEY, V., TURTON, J. F., HOFFMAN, P. N.; BENNETT, A. M. Investigation of healthcare-acquired infections associated with *Pseudomonas aeruginosa* biofilms in taps in neonatal units in Northern Ireland. **Journal of Hospital Infection**, v. 86, n. 1, 16-23, jan. 2014.

WANG, B. B.; PENG, D. C.; HOU, Y. P.; LI, H. J.; PEI, L. Y.; YU, L. F. The important implications of particulate substrate in determining the physicochemical characteristics of extracellular polymeric substances (EPS) in activated sludge. **Water research**, v. 58, p. 1-8, apr. 2014.

WANG, X.; QUINN, P. J. Lipopolysaccharide: Biosynthetic pathway and structure modification. **Progress in lipid research**, v. 49, n. 2, p. 97-107, apr. 2010.

WANG, Y. T.; LEE, M. F.; PENG, C. F. Mutations in the quinolone resistance determining regions associated with ciprofloxacin resistance in *Pseudomonas aeruginosa* isolates from Southern Taiwan. **Biomarkers and Genomic Medicine**, v. 6, n. 2, p. 79-83, june 2014.

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.

WHITELEY, M.; BANGERA, M. G.; BUMGARNER, R. E.; PARSEK, M. R.; TEITZEL, G. M.; LORY, S.; GREENBERG, E. P. Gene expression in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. **Nature**, v. 413, n. 6858, p. 860-864, oct. 2001.

WHITE, R. L.; BURGESS, D. S.; MANDURU, M.; BOSSO, J. A. Comparison of Three Different In Vitro Methods of Detecting Synergy: Time-Kill, Checkerboard, and E test. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 40, n. 8, p. 1914-1918, aug. 1996.

WIRADHARMA, N.; KHOE, U.; HAUSER, C. A.; SEOW, S. V.; ZHANG, S.; YANG, Y. Y. Synthetic cationic amphiphilic  $\alpha$ -helical peptides as antimicrobial agents. **Biomaterials**, v. 32, n. 8, p. 2204-2212, mar. 2011.

XIAO, J.; KLEIN, M. I.; FALSETTA, M. L.; LU, B.; DELAHUNTY, C. M.; YATES III, J. R.; HEYDORN, A.; KOO, H. The Exopolysaccharide Matrix Modulates the Interaction between 3D Architecture and Virulence of a Mixed- Species Oral Biofilm. **PLoS Pathogens**, v. 8, n. 4, e1002623, apr. 2012.

YATES, S. P.; MERRILL, A. R. Elucidation of eukaryotic elongation factor-2 contact sites within the catalytic domain of *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin A. **Biochem. J**, v. 379, n. 3, p. 563-572, may 2004.

YOSHIDA, S.; OGAWA, N.; FUJII, T.; TSUSHIMA, S. Enhanced biofilm formation and 3-chlorobenzoate degrading activity by the bacterial consortium of *Burkholderia* sp. NK8 and *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. **J. applied microb.**, v. 106, n. 3, p. 790-800, mar. 2009.