



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ  
FACULDADE DE FARMÁCIA, ODONTOLOGIA E ENFERMAGEM  
CURSO DE FARMÁCIA**

**IGOR NUNES SAMPAIO**

**APLICAÇÃO DO INIBIDOR DE *QUORUM SENSING* CURCUMINA COMO  
MODULADOR DE BIOFILMES BACTERIANOS**

**FORTALEZA**

**2017**

IGOR NUNES SAMPAIO

**APLICAÇÃO DO INIBIDOR DE *QUORUM SENSING* CURCUMINA COMO  
MODULADOR DE BIOFILMES BACTERIANOS**

Monografia apresentada ao Curso de Farmácia da Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do Título de Bacharel em Farmácia.

Orientadora: Profa. Dra. Débora Castelo Branco de Souza Collares Maia.

FORTALEZA

2017

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação  
Universidade Federal do Ceará  
Biblioteca Universitária

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

---

- S183a Sampaio, Igor Nunes.  
Aplicação do inibidor de quorum sensing curcumina como modulador de biofilmes bacterianos. : Pesquisa experimental / Igor Nunes Sampaio. – 2017.  
38 f. : il.
- Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem, Curso de Farmácia, Fortaleza, 2017.  
Orientação: Profa. Dra. Débora Castelo Branco de Souza Collares Maia.
1. Biofilmes. 2. Quorum Sensing. 3. Curcumina. I. Título.

CDD 615

---

IGOR NUNES SAMPAIO

**APLICAÇÃO DO INIBIDOR DE *QUORUM SENSING* CURCUMINA COMO  
MODULADOR DE BIOFILMES BACTERIANOS**

Monografia apresentada ao Curso de Farmácia da Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do Título de Bacharel em Farmácia.

Aprovada em: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_\_\_.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Dra. Débora Castelo Branco de Souza Collares Maia (Orientadora)  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Diva da Silva Tavares  
Centro Universitário Christus (Unichristus)

---

Fábio Rubens Barbosa Magalhães  
Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Médica - PPGMM (UFC)

À minha mãe, Vanda Sampaio, minha rainha e minha fortaleza. Dedico todo meu amor.

## **AGRADECIMENTOS**

À minha mãe, Antônia Vanda Nunes Sampaio, por todo o amor, carinho e dedicação. Por toda a ética e educação que me deu, dando bons exemplos e ajudando a superar obstáculos. Por sempre estar ao meu lado e sempre ter me apoiado em todas as decisões difíceis que precisei tomar até hoje, buscando sempre me compreender mesmo quando havia divergência de ideias e estava enfrentando seus próprios problemas.

A meu pai, William Sampaio Vieira, por todo o apoio financeiro que me deu que permitiu eu estar concluindo a faculdade, e por todos os conselhos válidos que me ajudaram.

Ao meu irmão, minha cunhada e meus sobrinhos, por serem uma presença alegre em minha vida, tentando demonstrar apoio quando achavam necessário.

A toda a minha família, por serem sempre tão amorosos e atenciosos e oferecerem todo o apoio que puderam, principalmente os que moram em Fortaleza e que sempre fazem questão de permanecerem presentes em minha vida

À Paloma Alves Cabral, Cecília Rodrigues de Moura e Wallady da Silva Barroso por serem grandes amigos sempre, mesmo quando não podemos estar nos vendo com frequência.

À Elisfábia Camelo do Nascimento pela sua amizade, doçura e bondade, que sempre tenta demonstrar o seu carinho, apesar do tempo corrido. Que continuemos nos vendo por muitos anos à frente.

À Gabriela de Paula Nakakura, pela sua grande amizade e cuidado, por sempre estar disponível quando preciso e por ser uma grande amiga. Por ter ajudado a superar muitos obstáculos e também ter proporcionado muitos momentos maravilhosos para nós do Mistura. Saudades.

Ao James Banner de Vasconcelos Oliveira, pelo seu amor, por sempre estar comigo me apoiando, por ter dividido todos esses anos de graduação, por ter sido minha inspiração quando estava desanimado, por ter me alegrado nos momentos difíceis. Por ter me inspirado e não me deixado desistir na várias etapas da vida que já passei até agora. Por ter sido um dos principais motivos de eu estar conseguindo concluir essa etapa da minha vida. Muito obrigado mesmo. Eu te amo!

Ao Fábio Ferreira Menezes e Fernanda Carlos Nóbrega pela grande ajuda no momentos finais da conclusão deste trabalho, além de todos esse anos de amizade na faculdade.

A todos meus amigos da faculdade, por terem feito esses anos de faculdade passarem menos densos por nossas vidas.

A todos os meus professores, pelo conhecimento transmitido. Um agradecimento especial àqueles gentis, éticos e demonstraram empatia com os estudantes, deixando claro que estão ali para nos dar o suporte que precisamos.

À profa. dra. Débora Castelo Branco de Souza Collares Maia, por ter aceitado ser minha orientadora, pela ajuda, dedicação e pelas correções, sendo calma e gentil sempre.

Aos mestrandos Bruno Rocha Amando, Fábio Rubens Barbosa Magalhães e ao doutorando Crister José Ocadaque, pela ajuda no desenvolvimento dos trabalhos.

À profa. dra. Diva da Silva Tavares por aceitar o convite para participar da banca e avaliar este trabalho.

## RESUMO

Biofilme é a principal forma de organização bacteriana na natureza. É uma comunidade microbiana complexa que possui um sistema de sinalização intercelular denominado de *quorum sensing*, mediado por moléculas chamadas autoindutoras. Diversas infecções crônicas e hospitalares podem ser associadas à formação de biofilmes e, por conta da maior resistência que os biofilmes apresentam aos antimicrobianos, o tratamento de tais infecções é dificultado, sendo necessária a busca por alternativas terapêuticas, como o inibidor de *quorum sensing* curcumina. O objetivo desse trabalho foi avaliar a ação *in vitro* do inibidor de *quorum sensing* curcumina contra biofilmes bacterianos em formação e maduros. O estudo foi realizado com 24 cepas de bactérias Gram positivas e Gram negativas. O teste da concentração inibitória mínima (CIM) foi feito através de microdiluição em placas fundo em U, como preconizado pelo Clinical Laboratory Standards Institute. O efeito modulador da curcumina em biofilmes em formação e em biofilmes maduros foi avaliado em placas de fundo chato, utilizando as concentrações de 513, 51 e 25  $\mu\text{M}$  de curcumina. A atividade metabólica do biofilme foi avaliada com resazurina, enquanto a biomassa foi quantificada pela técnica do cristal violeta. A curcumina apresentou inibição de bactérias na forma planctônica, sendo encontrada uma CIM de 513  $\mu\text{M}$ . A curcumina não demonstrou atividade contra biofilmes em formação de bactérias Gram positivas, porém, apresentou ação indutora do crescimento de Gram negativas na maior concentração testada (513  $\mu\text{M}$ ). Em biofilmes maduros, também ocorreu indução do crescimento deles na maior concentração utilizada, tanto nos cocos Gram positivos quanto nos bacilos Gram negativos. Desse modo, foi observada maior atividade da curcumina na indução de crescimento de biofilme por bacilos Gram negativos. Esses resultados mostram, possivelmente, outro tipo de ação desse composto, sugerindo que ele interfira na modulação de *quorum sensing* durante a fase de dispersão do biofilme. Porém, são necessários experimentos adicionais de modo a definir o seu espectro de ação.

**Palavras-chave:** Biofilmes. *Quorum Sensing*. Curcumina.

## ABSTRACT

Biofilm is the main form of bacterial organization in nature. It is a complex microbial community that has an intercellular signaling system called quorum sensing, mediated by molecules called auto-inducers. Several chronic and hospital infections can be associated with the formation of biofilms and, because of the greater resistance that biofilms present to antimicrobials, the treatment of such infections is difficult, and it is necessary to search for therapeutic alternatives, such as the quorum sensing inhibitor curcumin. The objective of this work was to evaluate the in vitro action of the quorum sensing inhibitor curcumin against bacterial biofilms in formation and mature. The study was carried out with 24 strains of Gram positive and Gram negative bacteria. The minimum inhibitory concentration (MIC) test was done by microdilution on U-bottom plates, as recommended by the Clinical Laboratory Standards Institute. The modulating effect of curcumin on growing biofilms and mature biofilms was evaluated on flat bottom plates using the concentrations of 513, 51 and 25  $\mu\text{M}$  curcumin. The metabolic activity of the biofilm was evaluated with resazurin, while the biomass was quantified by the crystal violet technique. Curcumin showed inhibition of planktonic bacteria, with a MIC of 513  $\mu\text{M}$ . Curcumin did not show activity against biofilms in the formation of Gram positive bacteria. However, Gram negative growth was detected in the highest concentration tested (513  $\mu\text{M}$ ). In mature biofilms, the curcumin induced their growth in the highest concentration used, both in Gram positive cocci and Gram negative bacilli. Thus, greater activity of curcumin was observed in the induction of biofilm growth by Gram negative bacilli. These results possibly show another type of action of this compound, suggesting that it interfere in *quorum sensing* modulation during the biofilm dispersion phase. However, additional experiments are needed to define its action spectrum

**Key Words:** Biofilms. Quorum Sensing. Curcumin.

## SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	10
2	OBJETIVOS.....	12
2.1	Objetivo Geral.....	12
2.2	Objetivos Específicos.....	12
3	REFERENCIAL TEÓRICO.....	13
3.1	Bactérias como agentes infecciosos.....	13
3.2	Biofilmes Bacterianos.....	14
3.3	Curcumina como inibidor de <i>quorum sensing</i> .....	16
4	METODOLOGIA.....	18
4.1	Local e tipo de estudo.....	18
4.2	Micro-organismos.....	18
4.3	Compostos e drogas utilizados.....	19
4.4	Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) da curcumina contra as cepas selecionadas.....	20
4.5	Avaliação do efeito <i>in vitro</i> do inibidor de <i>quorum sensing</i> sobre a formação de biofilmes de cocos Gram positivos e bacilos Gram negativos.....	21
4.6	Avaliação do efeito <i>in vitro</i> do inibidor de <i>quorum sensing</i> sobre biofilmes maduros de cocos Gram positivos e bacilos Gram negativos.....	24
4.7	Análises Estatísticas dos Resultados.....	24
5	RESULTADOS.....	25
5.1	Determinação de Concentração Inibitória Mínima e análise metabólica.....	25
5.2	Efeito da curcumina sobre biofilmes em formação de cocos Gram positivos e bacilos Gram negativos.....	25
5.3	Efeito da curcumina sobre biofilmes maduros de cocos Gram positivos e bacilos Gram negativos.....	27
6	DISCUSSÃO.....	30
7	CONCLUSÕES.....	33
8	REFERÊNCIAS.....	34

## 1 INTRODUÇÃO

As bactérias são micro-organismos que podem viver em diferentes ambientes, seja solo, água, superfícies inanimadas ou seres vivos, fazendo parte da microbiota desses sítios, como rochas, lagos, árvores e animais, vivendo em simbiose. Elas também estão envolvidas em uma grande variedade de patologias no ser humano como pneumonias, gastroenterites e meningites, elevando os custos com a saúde, aumentando as taxas de morbidade e mortalidade, assim diminuindo a qualidade de vida do indivíduo doente. Muitas dessas doenças estão associadas a formação de biofilmes, que elevam a resistência da bactéria, diminuindo a ação de antimicrobianos e dificultando o processo de cura (KRUMMENAUER et al, 2016; MENEZES; PORTO; PIMENTA, 2016).

Biofilme é uma comunidade de micro-organismos envoltos por uma matriz extracelular produzida por eles próprios e com alta organização. Eles podem se apresentar como mono ou multiespécie e podem estar aderidos a superfícies bióticas ou abióticas. Essa estrutura tem a função de conferir proteção contra ações externas, como agentes químicos, ação antimicrobiana, sistema imune e outras adversidades ambientais. Os biofilmes estão associados a diversas doenças e infecções, pois podem se formar em dentes, cateteres urinários ou venosos, próteses ou ainda em tecidos vivos. A formação e maturação do biofilme só é possível graças a um sistema de comunicação denominado *quorum sensing* (XAVIER, et al, 2003; OKSHEVSKY; MEYER, 2013; MENEZES; PORTO; PIMENTA, 2016).

O *quorum sensing* é composto por moléculas autoindutoras que os micro-organismos secretam a medida que o biofilme é formado, as quais serão responsáveis pela percepção da densidade populacional (através de sinalização celular), sincronia de expressão gênica, produção proteica, dentre outros. As principais formas de tratamento hoje utilizam antimicrobianos que acabam por forçar uma pressão seletiva e, conseqüentemente, a emergência de cepas. Hoje estudos mostram que substâncias moduladoras de *quorum sensing* inibem a formação e/ou maturação de biofilmes prevenindo ou auxiliando no tratamento dessas infecções. Um exemplo é a curcumina, composto majoritário encontrado no rizoma da *Curcuma longa*, também conhecida por açafrão da terra (UROZ; DESSAUX; OGER, 2009; DAMACENO; FARIAS, 2016).

Diante disso, a descoberta de novos antimicrobianos se faz necessária e a criação de novas estratégias para a prevenção e o tratamento dessas infecções. Assim, esse trabalho visa agregar conhecimento acerca da utilização da curcumina como modulador de *quorum sensing* para cocos Gram positivos e bacilos Gram negativos interferindo na dinâmica de formação e maturação de biofilmes.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo geral

Avaliar a ação *in vitro* do inibidor de *quorum sensing* curcumina sobre a dinâmica de formação de biofilmes por cocos Gram positivos e por bacilos Gram negativos de relevância médica.

### 2.2 Objetivos específicos

1. Determinar a concentração inibitória mínima (CIM) do inibidor de *quorum sensing* curcumina contra cocos Gram positivos e bacilos Gram negativos patogênicos;
2. Avaliar o efeito *in vitro* do inibidor de *quorum sensing* sobre a formação de biofilmes de cocos Gram positivos e de bacilos Gram negativos;
3. Avaliar o efeito *in vitro* do inibidor de *quorum sensing* sobre o biofilme maduro de cocos Gram positivos e de bacilos Gram negativos.

### 3 REFERENCIAL TEÓRICO

#### 3.1 Bactérias como agentes infecciosos

As bactérias são seres ubíquos, inclusive fazendo parte da microbiota de outros seres, como árvores e animais, e vivendo em simbiose com estes. Também são associadas com diversas patologias, como pneumonias, gastroenterites e meningites e estão comumente associadas à microbiota do indivíduo, causando prejuízos econômicos e sociais, além de aumentar as taxas de morbidade e mortalidade, assim diminuindo a qualidade de vida do indivíduo doente. Dentre as patologias de origem bacteriana muitas estão associadas à formação de biofilmes, que elevam as resistências da bactéria diminuindo o sucesso de tratamentos com antimicrobianos e dificultando o processo de cura (KRUMMENAUER et al, 2016; MENEZES; PORTO; PIMENTA, 2016).

De maneira geral, cocos Gram positivos e bacilos Gram negativos representam os principais agentes infecciosos humanos, com destaque para *Staphylococcus* spp., *Enterococcus* spp., *Escherichia coli*, *Salmonella* spp, *Aeromonas* spp, e *Klebsiella* spp. Em nível hospitalar, as mais importantes são *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus* spp., *Enterococcus* spp., as enterobactérias *E. coli*, e *Klebsiella pneumoniae*, além de *Pseudomonas aeruginosa* e *Acinetobacter baumannii* (MENEZES; PORTO; PIMENTA, 2016).

Em um ambiente hospitalar, há vários fatores que proporcionam aumento nas chances de infecção, como a realização de procedimentos invasivos, a imunidade reduzida (principalmente em unidade de terapia intensiva – UTI) e períodos prolongados de internação. Uma causa importante para isso ocorrer são as bactérias da microbiota humana, as quais a maioria é oportunista, podendo causar patologias quando o indivíduo fica susceptível. Assim, essas infecções podem ser adquiridas durante o internamento ou após a alta. Os procedimentos invasivos são um dos maiores riscos de aquisição de infecções pelos pacientes, destacando-se o uso prolongado de cateteres venosos e/ou urinários, próteses, implantes (como de válvulas cardíacas), bem como procedimentos de traqueostomia, endoscopia, entre outros (MENEZES; PORTO; PIMENTA, 2016).

O tratamento de infecções bacterianas é um grande problema para a saúde pública em todo o mundo devido ao aumento da resistência das principais bactérias patogênicas, principalmente, em ambiente hospitalar como consequência

do uso rotineiro de antimicrobianos. A elaboração de painéis com identificação e perfil de sensibilidade de bactérias isoladas de pacientes é extremamente importante para que o tratamento seja realizado de forma adequada, amenizando a pressão seletiva e diminuindo a probabilidade de resistência e falha terapêutica (KRUMMENAUER et al, 2016).

Um dos importantes fatores associados à falha terapêutica é a formação de comunidades com os mais diversos graus de complexidade, estando sempre associadas a superfícies bióticas ou abióticas. Essas comunidades são chamadas de biofilme e esta organização consiste em um mecanismo de sobrevivência para as bactérias, pois confere proteção as mesmas. Algumas infecções estão associadas à formação de biofilme, como endocardite (*Streptococcus mutans*, *S. aureus*) e cateteres (*E. coli*, *K. pneumoniae*). Esses micro-organismos são cocos e bacilos presentes na microbiota humana e podem se tornar patógenos. (KASNOWSKY et al, 2010).

### **3.2 Biofilmes bacterianos**

Biofilme é uma comunidade formada por células microbianas e sésseis associadas a uma superfície, seja ela biótica ou abiótica, e envolta de polímeros, os exopolissacarídeos (EPS), e outros constituintes orgânicos. O biofilme é constituído por cerca de 75 a 90% de matriz, formada por EPS, proteínas secretadas, ácidos nucleicos e células mortas (LI; TIAN, 2012). Enquanto isso, as células vivas são responsáveis por 10 a 25% e essas comunidades estão associadas às fases essenciais dos ciclos de nutrientes (como nitrogênio, carbono e enxofre). Possuem ubiquidade e podem atingir espessuras finas, da ordem de milímetros e micrômetros, até espessuras maiores, da ordem de centímetros. (FLEMMING; WINGENDER, 2010; OKSHEVSKY; MEYER, 2013).

Os biofilmes trazem muitos benefícios para as bactérias associadas, inclusive proteção. Por exemplo, elas possuem maior resistência à radiação UV, a predadores, à desidratação e também maior resistência à antimicrobianos e outros agentes químicos. Todos esses benefícios vêm, principalmente, devido à presença da matriz de EPS. O sistema de transporte de solutos em biofilmes é muito mais lento que nas células planctônicas e explica o crescimento mais lento dessas estruturas. Esse metabolismo também contribui para a ocorrência de infecções

crônicas associadas aos biofilmes e à resistência aumentada dos mesmos. (GARRET; BHAKOO; ZHANG, 2008;).

A formação do biofilme possui quatro etapas. Primeiramente, as células devem encontrar uma superfície orgânica ou inorgânica sólida com presença de substratos para condicionar a fixação. Para isso acontecer, deve haver a ação de forças, como a gravitacional e Van der Waals, ou de estruturas bacterianas, como as fímbrias e o pili. Há diversos processos que irão influenciar na adesão bacteriana, como energia disponível, temperatura, condições de pressão, divisão celular e produção e excreção de EPS (GARRET; BHAKOO; ZHANG, 2008; HEAD, 2016). À medida que as células vão se dividindo, os apêndices bacterianos começam a realizar ligações (oxidação) com a superfície, consolidando a ligação da bactéria à superfície, fazendo com que as células que antes estavam reversivelmente adsorvidas comecem a ficar imobilizadas e passar para um estado de adesão irreversível. Quando isso acontece, passa a haver a supressão gênica das estruturas flagelares e começa a produção de matriz extracelular que constituirá a maior parte do biofilme (XAVIER, et al, 2003; GARRET; BHAKOO; ZHANG, 2008).

Depois de uma fase de lenta proliferação, é observado um rápido crescimento populacional, a maturação do biofilme. Essa etapa dependerá física e quimicamente do ambiente, da bactéria e da disponibilidade de nutrientes. A partir de então, haverá a produção e excreção de polissacarídeos de adesão, além de cátions divalentes para que sejam fortalecidas as ligações entre as células do biofilme (GARRET; BHAKOO; ZHANG, 2008; HEAD, 2016).

Após o crescimento exponencial, seguirá a fase estacionária do crescimento do biofilme. Nela haverá a produção de enzimas que irão degradar os EPS da matriz, de forma a iniciar a fase de dispersão do biofilme, caracterizada pela liberação de bactérias que estavam agregadas ao biofilme. Essa fase do biofilme está intimamente relacionada às infecções crônicas. As bactérias dispersas voltarão a expressar os genes que estavam suprimidos, como os dos flagelos e irão fixar-se em outras superfícies para formar novos biofilmes (XAVIER, et al, 2003; GARRET; BHAKOO; ZHANG, 2008).

Nos biofilmes as bactérias secretam substâncias que são responsáveis pela comunicação e organização populacional do biofilme. Esse sistema é denominado de *quorum sensing* (QS) e é importante para a formação estrutural e

para a regulação de várias atividades celulares presentes na comunidade bacteriana (DAMACENO; FARIAS, 2016).

Também há importância dos biofilmes no contexto de infecções, pois várias estão associadas a eles, como cáries, endocardites e artrites. Em nível hospitalar há também uma gama de infecções importantes, como as causadas pela utilização de procedimentos ou dispositivos médicos, como cateteres, endoscopias, cirurgias e implantes. Tecidos vivos que permitam adesão facilitada, como válvulas cardíacas, também são alvos de infecções, possivelmente, os biofilmes estão associados com a persistência dessas infecções devido à aquisição de resistência a antimicrobianos pelas células bacterianas (taxa aumentada de transferência de plasmídeos, presença da matriz de EPS) (GARRET; BHAKOO; ZHANG, 2008; HEAD, 2016).

### **3.3 Curcumina como inibidor de *quorum sensing***

O *quorum sensing* é um mecanismo que consiste na liberação de diversas moléculas sinalizadoras para a matriz e para a superfície a fim de provocar a modulação de numerosas funções biológicas das bactérias e de orquestrar a expressão de genes (UROZ; DESSAUX; OGER, 2009).

O QS é composto por moléculas autoindutoras que estão presentes em todo o biofilme, tanto nas células quanto na matriz. Em grande parte, essas moléculas são compostos orgânicos que atuarão como sinalizadores celulares. Já foram identificadas diversas moléculas autoindutoras, como oligopeptídeos, N-acil-homoserina lactonas (AHL – AI1) e furanosil borato diéster (AI2). Dentre elas, as mais estudadas são as N-acil-homoserina lactonas, as quais são utilizadas por muitas bactérias Gram negativas. Já as Gram positivas utilizam principalmente oligopeptídeos (DAMACENO; FARIAS, 2016). No sistema AI-1 (autoindutor-1) as moléculas sinalizadoras, como AHL, são sintetizadas constitutivamente em baixas concentrações pelo gene de síntese LuxI. Com alta densidade celular, o AI-1 se ligará ao seu receptor e causará ativação do regulador de transcrição LuxR. O AI-LuxR se ligará ao DNA e promoverá a expressão de genes regulados pelo sistema QS. O sistema AI-2 é regulado pelas furanosil borato diéster, produzidas pelo LuxS, e têm sido associadas como um modulador universal de QS, caracterizadas como sinalizadores inter-espécies (READING; SPERANDIO, 2005; DAMACENO; FARIAS, 2016).

O sistema QS pode ser inibido de algumas formas, como por meio da redução da atividade do receptor de proteína AHL ou da AHL sintetase, inibindo a produção de moléculas de QS, a degradação da AHL e imitando as moléculas sinalizadoras, principalmente usando compostos como análogos destas moléculas (KALIA, 2013).

Um bom inibidor de *quorum sensing* (QSI) é definido como possuidor dos seguintes critérios: ser uma molécula pequena com capacidade para reduzir eficientemente a expressão de genes regulados pelo QS, ser altamente específica para determinado regulador de QS e sem causar efeitos adversos sobre a bactéria ou o hospedeiro, ser quimicamente estável e resistente à degradação por vários sistemas metabólicos do hospedeiro, e ser preferencialmente mais longo que o AHL nativo. Um exemplo deles é a curcumina (KALIA, 2013).

A curcumina é um pigmento amarelo extraído da *Curcuma longa*, também conhecida como açafrão da terra, sendo uma mistura de três compostos em que ela é a majoritária. Ela é muito utilizada na área alimentícia, como especiaria, e na medicina, como anti-inflamatório, antioxidante e antimicrobiano (NEGI et al, 1999).

Seu efeito antimicrobiano já foi relatado na literatura e mostra que ela é ativa contra diversas bactérias importantes epidemiologicamente, como *S. aureus*, *E. faecalis*, *E. coli*, *K. pneumoniae* e *P. aeruginosa*. Muitos estudos também têm atribuído à curcumina propriedades moduladoras de biofilmes, agindo sobre o sistema de QS e inibindo a produção de fatores de virulência, que são de suma importância na resistência dos biofilmes aos antimicrobianos (KALI et al, 2016).

## 4 METODOLOGIA

### 4.1 Local e tipo de estudo

Este trabalho trata-se de uma pesquisa experimental, realizada no Laboratório de Bacteriologia que se localiza no Centro de Biomedicina, pertencente à Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará (UFC).

### 4.2 Micro-organismos

Para a realização do estudo, foram utilizadas 24 cepas selecionadas de acordo com o seu perfil de formação de biofilme, sendo que as escolhidas neste estudo foram formadoras moderadas formadoras de biofilme. Essas cepas eram constituídas de cocos Gram positivos e bacilos Gram negativos comumente associados às infecções nosocomiais sendo as cepas de *Staphylococcus aureus* (3 sensíveis, sendo uma ATCC, e 2 resistentes), *Staphylococcus epidermidis* (1 ATCC e 2 resistentes), *Enterococcus faecium* (1 sensível), *Enterococcus faecalis* (1 ATCC e 2 resistentes), *Escherichia coli* (3 sensíveis, sendo uma ATCC, e 3 resistentes), *Klebsiella pneumoniae* (3 sensíveis e 3 resistentes)(Quadro 01). As cepas utilizadas na pesquisa foram doadas pelo Laboratório de Bacteriologia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará.

**Quadro 01:** Descrição das 24 cepas utilizadas:

CEPA	SENSIBILIDADE	SÍTIO
<i>Staphylococcus aureus</i>	Sensível à Oxacilina	Sangue
	Sensível à Oxacilina	Ponta de cateter
	Resistente à Oxacilina	Sangue
	Resistente à Oxacilina	Sangue
<i>S. aureus</i> (ATCC 29213)	Sensível à Oxacilina	ATCC
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	Resistente à Oxacilina	Hemocultura
	Resistente à Oxacilina	Hemocultura
<i>S. epidermidis</i> (ATCC 12228)	Sensível à Oxacilina	ATCC
<i>Enterococcus faecium</i>	Resistente à Vancomicina	Swab retal
<i>Enterococcus faecalis</i>	Sensível à Vancomicina	Urina

	Resistente à Vancomicina	Swab retal
<i>E. faecalis</i> (ATCC 29212)	Sensível à Vancomicina	ATCC
<i>Escherichia coli</i>	Sensível à Carbapenêmicos	Urina
	Sensível à Carbapenêmicos	Urina
	Resistente à Carbapenêmicos	Urina
	Resistente à Carbapenêmicos	Urina
	Resistente à Carbapenêmicos	Urina
<i>E. coli</i> (ATCC 25922)	Sensível à Carbapenêmicos	ATCC
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Sensível à Carbapenêmicos	Urina
	Sensível à Carbapenêmicos	Urina
	Sensível à Carbapenêmicos	Urina
	Resistente à Carbapenêmicos	Urina
	Resistente à Carbapenêmicos	Urina
	Resistente à Carbapenêmicos	Urina

**Fonte:** Laboratório de Bacteriologia

#### 4.3 Compostos e drogas utilizados

Foi utilizado curcumina (Sigma), diluída em Hidróxido de Sódio (NaOH). Para o teste de sensibilidade foi utilizado ciprofloxacino (Sigma). No teste de atividade metabólica foi utilizada resazurina (Sigma).

#### 4.4 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) da curcumina contra as cepas selecionadas

A sensibilidade das 24 cepas bacterianas na sua forma planctônica foi avaliada ao inibidor de *quorum sensing* curcumina (PACKIAVATHY et al., 2013), segundo metodologia preconizada pelo documento M7-A9 do Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI, 2012), para determinação da concentração inibitória mínima (CIM).

As cepas foram previamente repicadas do meio estoque para placas com ágar Brain Heart Infusion (BHI) e incubadas a 37° C por 24 horas em estufa bacteriológica para promoção do seu crescimento. Após esse período, foi adicionado 1000 µL de solução fisiológica em 24 tubos de hemólise e com auxílio de uma alça bacteriológica uma pequena colônia foi retirada e adicionada aos tubos até que os mesmos atingissem a escala de 0,5 de Mc Farland que corresponde a  $1,5 \times 10^8$  U.F.C./mL (inóculo 1).

Posteriormente, foi realizada a diluição de 1:10 de todas as cepas utilizando 100 µL do inóculo preparado anteriormente mais 900 µL de caldo Mueller Hinton (inóculo 2), e, após isso, houve mais uma diluição, agora de 1:15, utilizando 86 µL do inóculo 2 em 1.220 µL de caldo Mueller Hinton (inóculo 3), ficando com concentração final de  $5 \times 10^5$  U.F.C./mL.

A curcumina em estoque possuía uma concentração de 16.700 µM e foi diluída para chegar a uma concentração final de 2.054 µM, utilizando 246 µL do composto em estoque mais 1.754 µL de caldo Mueller Hinton.

Para o teste foram utilizadas placas de poliestireno de 96 poços com fundo em U, pois permitem melhor visualização dos resultados. Foram adicionados em cada poço 100 µL de caldo Mueller Hinton previamente, após esse procedimento, foram adicionados 100 µL da curcumina diluída na primeira coluna e com o auxílio de uma pipetador multicanal, foi transferido 100 µL da coluna 1 para a 2 homogeneizando e, assim, sucessivamente, até a coluna 10. A coluna 12 foi utilizada como controle de esterilidade. Após esse procedimento, foram adicionados 100 µL do inóculo 3 do poço 1 ao poço 11, deixando todos os poços com 200 µL. A coluna 11 foi o controle de crescimento do teste por só possuir o meio de cultura e o inóculo bacteriano.

Após isso, as placas foram incubadas por 24 horas a 37° C em estufa bacteriológica e analisadas no dia posterior para determinação da concentração inibitória mínima (CIM) do composto, para que pudéssemos trabalhar com concentrações subinibitórias nos demais testes. Foram inclusos nestes ensaios a cepa controle de *E. coli* (ATCC 25922) e uma droga antibacteriana clássica, a ciprofloxacina (CLSI, 2012). A CIM para o composto testado foi definida como a menor concentração capaz de causar 80% ou mais de inibição, quando comparado ao controle de crescimento, para que pudessem ser visualizadas diferenças entre as concentrações utilizadas sobre o biofilme nos testes que se seguiram.

#### **4.5 Avaliação do efeito *in vitro* do inibidor de *quorum sensing* sobre a formação de biofilmes de cocos Gram positivos e bacilos Gram negativos**

Foi avaliado o efeito da curcumina sobre a formação de biofilmes pelas cepas selecionadas, de acordo com Bandeira et al., 2013. Nas cepas cedidas pelo Laboratório de Bacteriologia da UFC foram avaliadas à formação de biofilme *in vitro*. Para isso foram repicadas e incubadas por 24 horas a 37° C. Após crescimento de 24h das amostras, foi preparado em solução fisiológica a 0,9% com o inóculo a uma escala de 6 de Mc Farland ( $1,8 \times 10^9$  UFC/ml). Nesse procedimento, foram utilizadas placas de 96 poços de fundo chato, pois permitem melhor adesão do biofilme nas paredes, com 175 µL de BHI enriquecido com 1% de glicose. Para seu preenchimento usou-se pipeta multicanal. Após isso, adicionaram-se 25 µL da suspensão bacteriana em cada poço. Incubou-se a 37°C por 48 horas. Todos os testes foram executados em triplicata em dois momentos distintos.

Para tanto, foram utilizadas três concentrações fixas para o composto testado, CIM (513 µM), CIM/10 (51 µM) e CIM/20 (25 µM). Inicialmente, as culturas bacterianas foram crescidas em ágar BHI e incubadas a 37°C por 24 horas. Posteriormente, as placas foram preparadas com 175 µL de BHI caldo enriquecido com 1% de glicose, contendo uma das três concentrações pré-estabelecidas para cada composto teste, para avaliar o efeito sobre a formação do biofilme. A diluição para encontrar o volume do composto para cada concentração se deu com seguintes cálculos:

- Primeiramente foi quantificado o volume necessário de caldo BHI enriquecido com 1% de glicose acrescido das três concentrações de curcumina, ficando

17.000  $\mu\text{L}$  para a primeira diluição (diluição 1) e 13.000 para a segunda e terceira diluição (diluição 2 e diluição 3);

- Em seguida foi realizado o ajuste de concentração do composto para que quando o inóculo bacteriano fosse adicionado ao poço a concentração final fosse a escolhida do teste de sensibilidade, para isso, utilizamos a fórmula  $C_1 \cdot V_1 = C_2 \cdot V_2$  sendo  $C_1$  a concentração da curcumina que inicialmente utilizamos para a diluição,  $V_1$  o volume inicial do poço (175  $\mu\text{L}$ ),  $C_2$  a concentração final em  $\mu\text{L}$  que o poço (513) e  $V_2$  o volume final que o poço (200  $\mu\text{L}$ )

$$C_1 \cdot V_1 = C_2 \cdot V_2$$

$$C_1 \cdot 175 = 513 \cdot 200$$

$$C_1 = 513 \cdot 200 / 175$$

$$\longrightarrow C_1 = 586 \mu\text{M}$$

- Encontrando a concentração inicial da curcumina para as diluições, a mesma fórmula foi utilizada para preparar as três concentrações usadas no experimento com o intuito de acharmos o volume de composto para as diluições, para a diluição 1 usamos a concentração de curcumina de estoque  $C_1 = 16.700$ , o  $V_1$  é o valor que queríamos encontrar,  $C_2$  foi o valor que encontramos no ajuste da concentração (586) e  $V_2$  o volume final do poço (200  $\mu\text{L}$ ):

$$C_1 \cdot V_1 = C_2 \cdot V_2$$

$$16.700 \cdot V_1 = 586 \cdot 200$$

$$C_1 = 586 \cdot 200 / 16.700$$

$$\longrightarrow C_1 = 596 \mu\text{L}$$

- Para a diluição 2 usamos a concentração de curcumina do ajuste  $C_1 = 586$ , o  $V_1$  é o valor que queríamos encontrar,  $C_2$  foi o valor que encontramos no ajuste da concentração dividido por 10 (58,6) e  $V_2$  o volume final do poço (200  $\mu\text{L}$ ):

$$C_1 \cdot V_1 = C_2 \cdot V_2$$

$$586 \cdot V_1 = 58,6 \cdot 200$$

$$C_1 = 58,6 \cdot 200 / 586$$

$$\longrightarrow C_1 = 1.300 \mu\text{L}$$

- Para a diluição 3 usamos a concentração de curcumina do ajuste  $C_1 = 586$ , o  $V_1$  é o valor que queríamos encontrar,  $C_2$  foi o valor que encontramos no ajuste da concentração dividido por 20 (29,3) e  $V_2$  o volume final do poço (200  $\mu\text{L}$ ):

$$C_1 \cdot V_1 = C_2 \cdot V_2$$

$$586 \cdot V_1 = 29,3 \cdot 200$$

$$C_1 = 29,3 \cdot 200 / 586$$

$$\longrightarrow C_1 = 650 \mu\text{L}$$

Com isso na diluição 1 foi utilizado 596  $\mu\text{L}$  de curcumina na concentração de estoque mais 16.404  $\mu\text{L}$  de caldo BHI enriquecido de 1% de glicose, na diluição 2 foi utilizado 1.300  $\mu\text{L}$  da diluição 1 mais 11.700  $\mu\text{L}$  de caldo BHI enriquecido de 1% de glicose e na diluição 3 utilizado 650  $\mu\text{L}$  mais 12.350  $\mu\text{L}$  de caldo BHI enriquecido de 1% de glicose. O volume calculado foi o suficiente para que pudéssemos adicionar 175  $\mu\text{L}$  de meio acrescido das concentrações CIM, CIM/10 e CIM/20 em todas as 3 placas de poliestireno de 96 poços de fundo chato.

Em seguida, foram adicionados aos poços teste 25  $\mu\text{L}$  do inóculo de cultura bacteriana preparado em solução fisiológica a 0,9% a uma escala de 6 de Mc Farland ( $1,8 \times 10^9$  UFC/ml). As placas foram incubadas a 37 °C, por 48 horas, para o desenvolvimento de biofilme. Após a incubação, foi realizado o teste de atividade metabólica com resazurina adicionando 20  $\mu\text{L}$  em cada poço e aguardando por uma hora (SARKER et al., 2007). A resazurina serve de substrato cromogênico para enzimas desidrogenases e age como indicador de oxirredução, denunciando se houve produção de metabólitos pelas bactérias. Após esse tempo, foi observado se houve mudança de coloração de azul para róseo (redução da resazurina em resofurina) (RIBEIRO et al., 2004).

Após a avaliação do metabolismo, realizou-se a quantificação da biomassa pela técnica do cristal violeta, pois é um corante que possui alta afinidade por moléculas orgânicas (BANDEIRA et al., 2013). As placas foram lavadas com tampão fosfato salina a 1% (PBS) para remover as bactérias não aderidas, adicionando em cada poço 200  $\mu\text{L}$ . Esse procedimento foi realizado mais duas vezes. Posteriormente as placas foram deixadas para secagem por 10 a 15 minutos. Após isso, foram adicionados 200  $\mu\text{L}$  de metanol PA em cada poço e aguardado por 15 minutos para fixação do biofilme. As placas foram deixadas para secagem por 5 a 10 minutos e logo em seguida foram adicionados 200  $\mu\text{L}$  de cristal violeta (0,3%) a

cada poço e incubados por 10 minutos. Passando esse tempo, as placas foram lavadas novamente com PBS como descrito acima e deixadas para secar por 10 a 15 minutos. Foram adicionados 200 µL de ácido acético a 33% em cada poço e esperou-se por 15 minutos, quando foram então transferidos para novas placas de 96 poços estéreis e analisadas por espectrofotômetro no comprimento de 490 nm.

#### **4.6 Avaliação do efeito *in vitro* do inibidor de *quorum sensing* sobre biofilmes maduros de cocos Gram positivos e bacilos Gram negativos**

Para avaliar o efeito desses compostos sobre o biofilme formado, o mesmo procedimento de formação de biofilme foi realizado (BANDEIRA et al. 2013), na ausência de curcumina. Após as 48 horas de incubação, foi feita uma lavagem com PBS e adicionados outros 200 µL de BHI enriquecido com 1% de glicose acrescido das concentrações decrescentes acima citadas, a partir da CIM do composto, ao biofilme maduro e incubados por mais 24 horas. Após isso, foi realizada a avaliação da atividade metabólica e quantificação da biomassa. Todos os experimentos foram realizados em triplicata, em dois momentos distintos (BANDEIRA et al., 2013).

#### **4.7 Análise Estatística**

Os dados de absorbância da biomassa forma utilizados para avaliação do efeito da curcumina sobre biofilmes de cocos Gram positivos e de bacilos Gram negativos em formação e maduros. Quando os dados apresentaram distribuição normal, as diferenças entre eles foram avaliadas por ANOVA, seguida do pós-teste de Tukey, ou teste T para amostras pareadas. Entretanto, quando os dados apresentaram distribuição não paramétrica, foram utilizados o teste de Friedman, seguido do pós-teste de Dunn, ou o teste de Wilcoxon para amostras pareadas. Em todos os casos, foi adotado um nível de significância menor que 5% ( $P < 0,05$ ), para tomar conclusões significativas.

## 5 RESULTADOS

### 5.1 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e avaliação da atividade metabólica dos biofilmes

O teste foi realizado para todas as 24 cepas que foram descritas. Foram testadas dez concentrações diluídas progressivamente na razão de 2 que variaram de 1  $\mu\text{M}$  a 513  $\mu\text{M}$ . Foi encontrada inibição de 80% ou menos na concentração de 513  $\mu\text{M}$ . Nas demais concentrações, não foi observada inibição do crescimento. Portanto, a CIM foi definida como sendo 513  $\mu\text{M}$ .

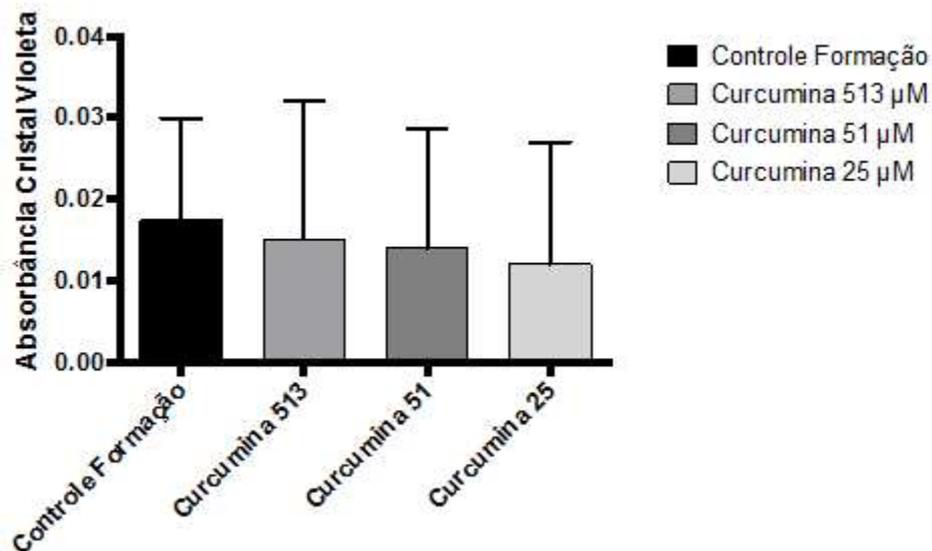
Para a atividade metabólica, a resazurina foi utilizada em todas as 24 cepas e nos controles de crescimento e de esterilidade. Foi observado que nenhuma concentração de curcumina inibiu os biofilmes em formação e os biofilmes maduros de cocos Gram positivos e de bacilos Gram negativos.

### 5.2 Efeito da Curcumina sobre biofilmes em formação de cocos Gram positivos e bacilos Gram negativos

A curcumina foi testada nas concentrações de 513  $\mu\text{M}$ , 51  $\mu\text{M}$  e 25  $\mu\text{M}$  para todas as 24 cepas. Os resultados foram agrupados por gênero bacteriano, pois eles foram similares entre si.

Quanto aos biofilmes das cepas de *Staphylococcus* spp. e de *Enterococcus* spp. em formação, a curcumina não interferiu nos resultados obtidos, não sendo observadas diferenças significativas entre o controle e os tratamentos com as três concentrações do composto. Foram obtidos os seguintes valores de biomassa:  $0,0174 \pm 0,0125$  para o controle, e  $0,0151 \pm 0,0169$ ,  $0,0140 \pm 0,0146$  e  $0,0120 \pm 0,0149$  para crescimento na presença de 513  $\mu\text{M}$ , 51  $\mu\text{M}$  e 25  $\mu\text{M}$  de curcumina, respectivamente (Figura 1).

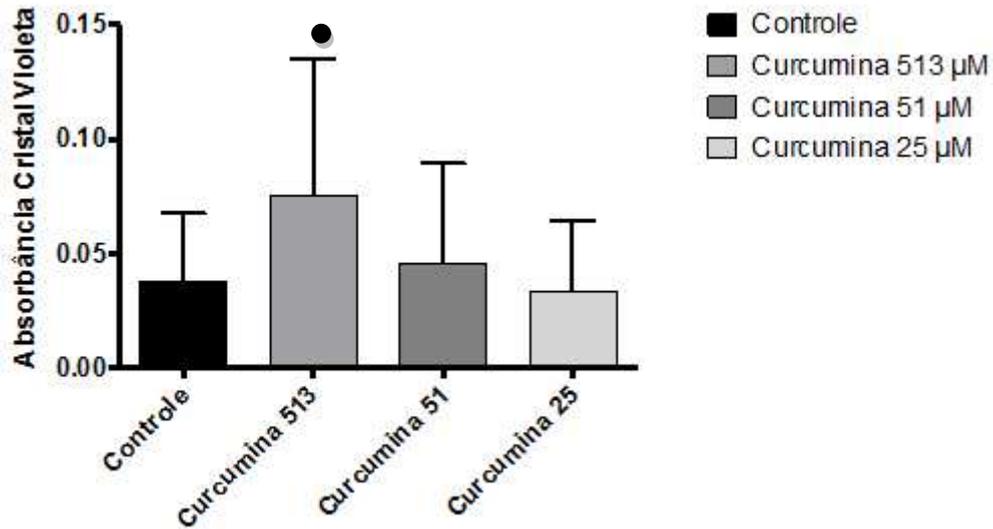
**Figura 1** – Atividade da Curcumina sobre a formação de biofilmes por cocos Gram positivos.



**Fonte:** Dados da Pesquisa.

Já para os biofilmes em formação de *E. coli* e *K. pneumoniae*, foram observados valores de absorbância de  $0,0378 \pm 0,0296$  para o controle, e  $0,0756 \pm 0,0596$ ,  $0,0456 \pm 0,440$  e  $0,0335 \pm 0,0313$  para crescimento na presença de 513 µM, 51 µM e 25 µM de curcumina, respectivamente. Foi observado um aumento de biomassa estatisticamente significativo ( $P < 0,05$ ) na concentração de 513 µM, em relação ao controle e às outras duas concentrações (Figura 2). Foi observada uma redução significativa ( $P < 0,05$ ) na biomassa do biofilme de *E. coli*, em comparação ao controle de crescimento, quando esses biofilmes foram formados na presença de 25 µM de curcumina (Tabela 1). Para *K. pneumoniae* encontrou-se uma indução significativa da concentração 513 µM em relação ao controle e à concentração 25 µM. Todos os dados de absorbância para os biofilmes em formação podem ser encontrados na Tabela 1.

**Figura 2** – Atividade da Curcumina sobre a formação de biofilme de bacilos Gram negativos.



●: P < 0,05 em relação ao controle de crescimento. **Fonte:** Dados da Pesquisa.

**Tabela 1** – Atividade da Curcumina na formação de biofilmes por cocos Gram positivos e bacilos Gram negativos.

Gêneros Bacterianos	Controle	Curcumina (µM)		
		513	51	25
Gram Positivas <i>Enterococcus</i> spp.	0,0112±0,0070	0,0133±0,0169	0,0160±0,0239	0,0094±0,0179
<i>Staphylococcus</i> spp.	0,0206±0,0138	0,0160±0,0180	0,0130±0,0093	0,0134±0,0143
Gram Negativas <i>Escherichia coli</i>	0,0172±0,0128	0,0267±0,0348	0,0111±0,0129	0,0115±0,0162*
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	0,0584±0,0274	0,1245±0,0296*	0,0802±0,0349	0,0554±0,0271

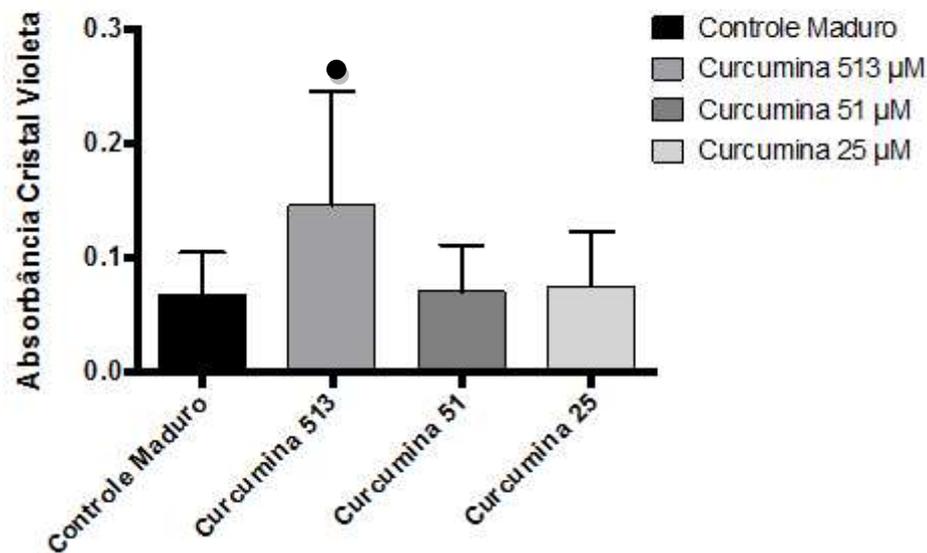
\*: P < 0,05, em relação ao controle de crescimento. **Fonte:** Dados da Pesquisa.

### 5.3 Efeito da Curcumina sobre biofilmes maduros de cocos Gram positivos e bacilos Gram negativos

Para os biofilmes maduros de *Staphylococcus* spp. e *Enterococcus* spp., foram observados valores de absorbância da biomassa de 0,0677±0,0376 para o controle, e 0,1466±0,0989, 0,0707±0,0408 e 0,0752±0,0475 para a adição de 513 µM, 51 µM e 25 µM de curcumina aos biofilmes maduros, respectivamente (Figura

3). Foi observado um aumento estatisticamente significativo ( $P < 0,05$ ) da biomassa, após exposição a 513  $\mu\text{M}$ , em relação ao controle e as outras duas concentrações avaliadas. Para *Staphylococcus* spp., especificamente, foi observada também um aumento significativo ( $P < 0,05$ ), após exposição a 513  $\mu\text{M}$ , em relação ao controle e à concentração de 51  $\mu\text{M}$  (Tabela 2). Não houve diferenças significativas para *Enterococcus* spp.

**Figura 3** – Efeito da Curcumina sobre biofilmes maduros de cocos Gram positivos.

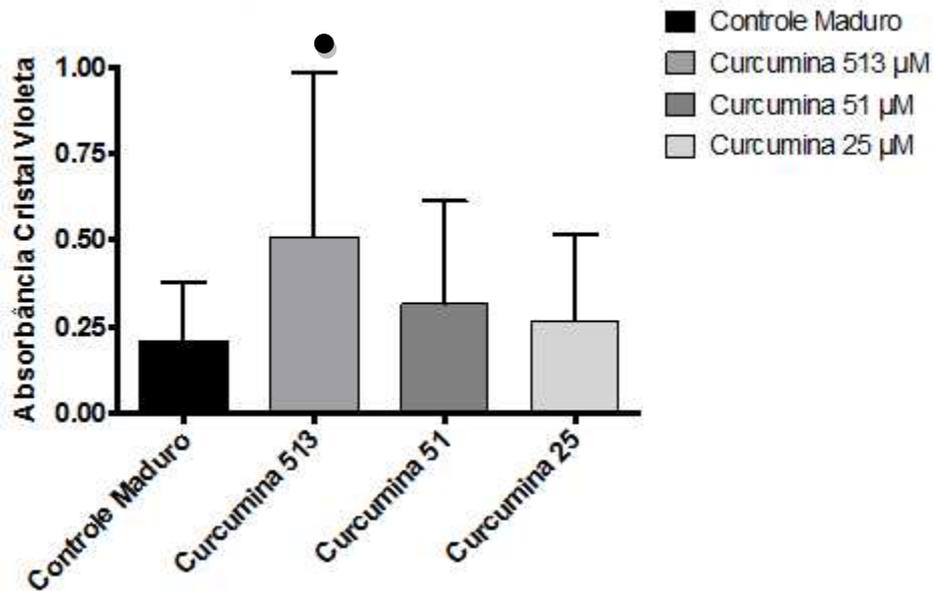


●:  $P < 0,05$  em relação ao controle de crescimento. **Fonte:** Dados da Pesquisa.

Já para os biofilmes maduros de *E. coli* e *K. pneumoniae* foram observados valores de absorbância de  $0,2107 \pm 0,1689$  para o controle, e  $0,5089 \pm 0,4726$ ,  $0,3167 \pm 0,2960$  e  $0,2664 \pm 0,2497$ , após exposição dos biofilmes a 513  $\mu\text{M}$ , 51  $\mu\text{M}$  e 25  $\mu\text{M}$  de curcumina, respectivamente. Foi notado um aumento estatisticamente significativo ( $P < 0,05$ ) na biomassa, após exposição do biofilme a 513  $\mu\text{M}$ , em relação ao controle de crescimento e às outras duas concentrações avaliadas, e um aumento ( $P < 0,05$ ) na biomassa, após a exposição a 51  $\mu\text{M}$ , em relação ao controle (Figura 4). Adicionalmente foi observada um aumento significativo da biomassa na concentração de 513  $\mu\text{M}$  em relação ao controle, para *E. Coli*, e nas concentrações de 513  $\mu\text{M}$  e 51  $\mu\text{M}$  em relação ao controle, para *K.*

*pneumoniae* (Tabela 2). Todos os dados de absorvância para os biofilmes maduros podem ser encontrados na Tabela 2.

**Figura 4** – Efeito da Curcumina sobre biofilmes maduros de bacilos Gram negativos.



●: P < 0,05 em relação ao controle de crescimento. **Fonte:** Dados da Pesquisa.

**Tabela 2** – Atividade da curcumina sobre biofilmes maduros de cocos Gram positivos e bacilos Gram negativos.

Gêneros Bacterianos	Controle	Curcumina ( $\mu\text{M}$ )		
		513	51	25
Gram Positivas <i>Enterococcus</i> spp.	0,0575 $\pm$ 0,0358	0,1159 $\pm$ 0,0939	0,0630 $\pm$ 0,0455	0,0628 $\pm$ 0,0445
<i>Staphylococcus</i> spp.	0,0727 $\pm$ 0,0398	0,1620 $\pm$ 0,1038*	0,0745 $\pm$ 0,0409	0,0814 $\pm$ 0,0507
Gram Negativas <i>Escherichia coli</i>	0,0863 $\pm$ 0,0730	0,1113 $\pm$ 0,0891*	0,0985 $\pm$ 0,1073	0,1156 $\pm$ 0,1237
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	0,3351 $\pm$ 0,1424	0,9065 $\pm$ 0,3225*	0,5348 $\pm$ 0,2589*	0,4173 $\pm$ 0,2593

\*: P < 0,05 em relação ao controle de crescimento. **Fonte:** Dados da Pesquisa.

## 6 DISCUSSÃO

No teste de sensibilidade para determinar a concentração inibitória mínima da curcumina contra a forma planctônica de cocos Gram positivos e bacilos Gram negativos, foi observado que houve inibição do crescimento nas concentrações de 513  $\mu\text{M}$  e de 256  $\mu\text{M}$ . Packiavathy et al. (2014) encontraram concentrações inibitórias mínimas de curcumina contra *E. coli* e *Pseudomonas aeruginosa* de 192  $\mu\text{g/mL}$  (equivalente a 521  $\mu\text{M}$ ), que foi um resultado similar ao encontrado neste trabalho. Bahari et al. (2017) usaram o método da microdiluição com *P. aeruginosa* e determinaram uma CIM de 128  $\mu\text{g/mL}$  (equivalente a 347  $\mu\text{M}$ ). Já Neelakantan et al. (2013) encontraram uma CIM de 625  $\mu\text{g/mL}$  (equivalente a 1696  $\mu\text{M}$ ) de curcumina para cepas de *E. faecalis*, valor bastante elevado comparado ao deste estudo. Kali et al. (2016) encontrou MIC da curcumina igual a 126,9 mg/L (equivalente a 344  $\mu\text{M}$ ) para Gram positivas (*S. aureus*, *E. faecalis*) e de 117,4 mg/L (equivalente a 318  $\mu\text{M}$ ) para Gram negativas (*E. coli*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa*).

Sethupathy et al. (2016) indicou uma potente e consistente atividade inibidora de *quorum sensing* da curcumina *in vitro* contra isolados clínicos de *P. aeruginosa*, prejudicando a produção de fatores de virulência como protease, elastase, piocianina, além da formação de biofilmes. Isso indica que a atividade moduladora de QS da curcumina é multifatorial. Eles encontraram inibição de biofilme em formação e de fatores de virulência para *P. aeruginosa* na concentração de 5  $\mu\text{g/mL}$  (equivalente a 13,6  $\mu\text{M}$ ), demonstrando grande significância, podendo inclusive ser utilizada em combinação com outros antibióticos.

Bahari et al. (2017) demonstrou uma significativa diminuição de biofilmes em formação de *P. aeruginosa* quando ela estava crescendo sob uma concentração de 32  $\mu\text{g/mL}$  (equivalente a 87  $\mu\text{M}$ ). O principal sistema de QS utilizado pela *P. aeruginosa* é o AH1-AHL, especificamente os autoindutores N-butanoil-1-homoserino lactona (C4-HSL) e N-dodecanoil-1-homoserino lactona (C12-HSL), os quais pertencem a este sistema. Os autores também mostraram que a concentração testada do QSI foi capaz de inibir a C4-HSL e a C12-HSL em 66% e 67%, respectivamente. Favre-Bonté; Köhler; Van-Delden (2003) tentaram definir o papel desses autoindutores no biofilme e utilizaram cepas de *P. aeruginosa* com diferentes perfis gênicos. Os resultado mostraram que a C4-HSL é requerida para haja uma

formação do biofilme otimizada, pois as cepas que produziram mais desse AI conseguiram formar maior quantidade de biomassa. Além disso, foi adicionado C4-HSL exógeno durante a formação de biofilme das cepas que não o possuíam em grande quantidade e o crescimento final foi restaurado em 30% a 65%. Com a adição de C12-HSL, esse aumento foi para 30% a 75%. Além disso, o C12-HSL também exerce um papel essencial para a diferenciação do biofilme e desempenha sua função durante a etapa de adesão irreversível nas superfícies, onde há também influências do C4-HSL.

Packiavathy et al. (2014) relatou que a atividade moduladora da curcumina apresenta uma redução de biomassa de biofilme concentração-dependente, na qual desalojou biofilmes maduros de *E. coli* e *P. aeruginosa* em 52% e 89%, respectivamente, na concentração de 100 µg/mL (equivalente a 271 µM). Ele mostra também que a curcumina inibiu a produção de EPS nesses biofilmes num total de 50% e 97%, respectivamente, para esta mesma concentração. Esses resultados reforçam a ação multifatorial desse composto.

As concentrações relatadas que inibiram o crescimento de biofilmes em formação e maduros nesses estudos foram bem menores que 513 µM. Sugere-se que a curcumina utilizada em concentrações mais elevadas pode, possivelmente, modular um crescimento mais exacerbado tanto em biofilmes em formação quanto maduros.

Existem vários tipos de sistemas de QS com vários autoindutores que podem agir nesses receptores. Cada bactéria possui uma produção majoritária de determinadas moléculas moduladoras. Li; Tian (2012) trouxe em seu estudo exemplos desse fato, como a *P. aeruginosa* que utiliza C4-HSL e C12-HSL, e o *S. aureus* que utiliza AIP-I, AIP-II e AIP-IV. Nessas bactérias, esses AIs irão modular as principais funções de formação e estruturação do biofilme, além da produção de fatores de virulência. As AHLs são conhecidas por se difundirem livremente na membrana celular bacteriana, mas não apresentam essa mesma facilidade de se difundir pela matriz, por conta da sua composição diferente, dificultando que estes automoduladores atinjam os seus receptores. Porém, os oligopeptídeos das Gram positivas são mais influenciados por fatores físicos, químicos e biológicos dentro do biofilme porque eles são pequenos peptídeos que irão interagir mais facilmente com moléculas carregadas, formando ligações intermoleculares mais fortes. Além disso, Keller; Surette (2006) relataram que a produção de um peptídeo sinalizador por *S.*

*aureus* custa 184 ATPs, enquanto uma *P. aeruginosa* utiliza apenas 8 ATPs para produzir uma molécula de AHL. É notável que a disponibilidade de nutrientes e a fonte de energia são fatores importantes na produção de QS e nos biofilmes, principalmente em Gram positivas.

Li; Tian (2012) também relataram que moléculas que estimam a densidade populacional podem ser afetadas pela concentração de outra molécula sinalizadora, difusão limitada, acessibilidade do receptor, degradação e produção deste mesmo autoindutor, como acontece com os AI2. Sun et al. (2016) mostra que o sistema QS da *K. pneumoniae* é LuxS dependente, o qual está envolvido na via dos AI2, como o furanosil borato diéster. Além disso, Solano; Echeverz; Lasa (2014) relatam que a fase de dispersão do biofilme é essencial para que as bactérias escapem e colonizem outros nichos e há diferentes estratégias para isso acontecer, como finalizar a síntese de componentes da matriz do biofilme, degradar a matriz e romper as ligações covalentes realizadas na fase de adesão irreversível. Todos esses processos são regulados por moléculas de QS.

Baseado nisso, é suposto que a atividade da curcumina neste estudo basicamente foi restrita a induzir o crescimento dos biofilmes. Kalia (2013) relatou a existência de moléculas moduladoras que possuem grupos éster em suas estruturas, como é o caso do furanosil borato diéster, presente tanto em Gram positivas quanto em Gram negativas, e do ácido metil-éster palmítico, presente em Gram negativas. Já Yang et al. (2017) demonstrou a importância dos dois grupos metóxi ( $-OCH_3$ ), presentes na curcumina, em sua atividade anti-inflamatória, outro efeito pelo qual ela é conhecida, inibindo vários mecanismos inflamatórios. Baseado nisso, pode haver relação entre a curcumina e esses moduladores de QS, podendo o efeito da curcumina sobre os biofilmes estar relacionado aos dois grupos éster, devido à similaridade dos grupos químicos. Portanto, pode-se inferir que a curcumina tenha interagido com esses autoindutores ou mesmo com os receptores destes e, com isso, ela possa ter inibido a modulação que iria ativar genes que promoveriam a fase de dispersão do biofilme, sendo uma possível explicação para o aumento da biomassa na concentração de 513  $\mu$ M.

## 7 CONCLUSÃO

A curcumina apresentou uma boa inibição contra as cepas de bactérias de Gram positivas e Gram negativas na forma planctônica, encontrando uma concentração inibitória mínima que coincidiu com o relatado na literatura.

Quanto à sua ação *in vitro* sobre biofilmes, a curcumina mostrou um comportamento inesperado, induzindo o crescimento de biofilmes em formação de bacilos Gram negativos, ao ser utilizada a concentração mais elevada, e também induziu o crescimento em biofilmes maduros de cocos Gram positivos e bacilos Gram negativos na mesma concentração, divergindo dos resultados comumente encontrados na literatura. Esse fato sugere outra forma de interação da curcumina com os biofilmes. Diante disso, mais estudos são necessários de forma a conseguir elucidar os mecanismos de ação desse composto.

## REFERÊNCIAS

- BAHARI, Shahin et al. Inhibition of *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing by subinhibitory concentrations of curcumin with gentamicin and azithromycin. **Journal of Global Antimicrobial Resistance**, v. 10, p. 21-28. 2017.
- BANDEIRA, T. J. P. G et al. In vitro activities of amoxicillin-clavulanate, doxycycline, ceftazidime, imipenem, and trimethoprim-sulfamethoxazole against biofilm of Brazilian strains of *Burkholderia pseudomallei*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 57, p. 5771-5773, 2013.
- CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. (950 West Valley Road Suite 2500, Wayne, PA 19087 USA). **Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard—Tenth Edition (M07-A9)**, jan. 2012. Disponível em: <<https://www.researchgate.net/file.PostFileLoader.html?id=56466b465f7f71946b8b45f2&assetKey=AS%3A295464181223441%401447455558839>>. Acesso em: 10 jul. 2017.
- DAMACENO, Neila Batista; FARIAS, Luciana Ramalho. RELAÇÃO EXISTENTE ENTRE BIOFILMES BACTERIANOS, QUORUM SENSING, INFECÇÕES E RESISTÊNCIA A ANTIBIÓTICOS: UMA REVISÃO BIBLIOGRÁFICA. **Revista Brasileira de Pesquisa em Ciências da Saúde**, v. 3, n. 1, p. 46-51, 2016.
- FAVRE-BONTÉ, Sabine; KÖHLER, Thilo; VAN DELDEN, Christian. Biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa*: role of the C4-HSL cell-to-cell signal and inhibition by azithromycin. **Journal of antimicrobial chemotherapy**, v. 52, n. 4, p. 598-604, 2003.
- FLEMING, Hans-Curt; WINGENDER, Jost, The biofilm matrix. **Nature Reviews Microbiology**; [S.l.], v. 8, p. 623-633, set. 2010.
- GARRETT, Trevor Roger ; BHAKOO, Manmohan ; ZHANG, Zhibing . Bacterial adhesion and biofilms on surfaces. **Progress in Natural Science**, [S.l.], v. 18, n. 9, p. 1049-1056, set. 2008.

HEAD, David. Biomechanical Analysis of Infectious Biofilms. **Biophysics of Infection**. Springer International Publishing, maio. 2016. p. 99-114.

KALI, Arunava et al. Antibacterial synergy of curcumin with antibiotics against biofilm producing clinical bacterial isolates. **Journal of Basic and Clinical Pharmacy**, v. 7, n. 3, p. 93-97, jun. 2016.

KALIA, Vipin Chandra. Quorum sensing inhibitors: An overview. **Biotechnology Advances**, v. 31, p. 224-245. 2013.

KASNOWSKI, Maria Carmela et al. Formação de biofilme na indústria de alimentos e métodos de validação de superfícies. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, v. 15, p. 1-23, jul. 2010.

KELLER, Laurent; SURETTE, Michael G. Communication in bacteria: an ecological and evolutionary perspective. **Nature reviews. Microbiology**, v. 4, n. 4, p. 249, 2006.

KRUMMENAUER, Eliane Carlosso et al. Perfil de sensibilidade a antimicrobianos de bactérias isoladas no ambiente hospitalar. **Revista de Epidemiologia e Controle de Infecção**, Santa Cruz do Sul, v. 6, n. 3, p. 149-151, jul. 2016.

LI, Yung-Hua; TIAN, Xiaolin. Quorum sensing and bacterial social interactions in biofilms. **Sensors**, v. 12, n. 3, p. 2519-2538, 2012.

MENEZES, Joana Marília Rodrigues ; PORTO, Maria Luísa Souto ; PIMENTA, Carla Lauise R. M. Perfil da infecção bacteriana em ambiente hospitalar. **Revista de Ciências Médicas e Biológicas**, Salvador, v. 15, n. 2, p. 199-207, ago. 2016.

NEELAKANTAN, Prasanna et al. Effectiveness of curcumin against *Enterococcus faecalis* biofilm. **Acta Odontologica Scandinavica**, v. 71, p. 1453-1457. 2013.

NEGI et al. Antibacterial Activity of Turmeric Oil: A Byproduct from Curcumin Manufacture. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 47, n. 10, p. 4297-4300. 1999.

OKSHEVSKY, Mira; MEYER, Rikke Louise. The role of extracellular DNA in the establishment, maintenance and perpetuation of bacterial biofilms. **Critical reviews in microbiology**, v. 41, n. 3, p. 341-352, dez. 2013.

PACKIAVATHY, Issac Abraham Sybiya Vasantha et al. Prevention of quorum-sensing-mediated biofilm development and virulence factors production in *Vibrio* spp. by curcumin. **Applied Microbiology and Biotechnology**, [S.l.], v. 97, n. 23, p. 10177-10187, dez. 2013.

PACKIAVATHY, Isaac Abraham Sybiya Vasantha et al. Inhibition of biofilm development of uropathogens by curcumin – An anti-quorum sensing agent from *Curcuma longa*. **Food Chemistry**, v. 148, p. 453-460. 2014.

READING, Nicola C.; SPERANDIO, Vanessa. Quorum sensing: the many languages of bacteria. **FEMS microbiology letters**, v. 254, n. 1, p. 1-11, 2005.

RIBEIRO, Marta Osório et al. Avaliação de testes rápidos em microplacas usando indicadores de viabilidade celular para determinação da susceptibilidade de cepas de *Mycobacterium tuberculosis* à isoniazida e rifampicina. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v. 30, p. 4, 2004.

SARKER, Satyajit D.; NAHAR, Lutfun; KUMARASAMY, Yashodharan . Microtitre plate-based antibacterial assay incorporating resazurin as an indicator of cell growth, and its application in the in vitro antibacterial screening of phytochemicals. **Methods**, [S.l.], v. 42, n. 4, p. 321-321, jan. 2007.

SETHUPATHY, Sivasamy et al. Proteomic analysis reveals modulation of iron homeostasis and oxidative stress response in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 by curcumin inhibiting quorum sensing regulated virulence factors and biofilm production. **Journal of proteomics**, v. 145, p. 112-126, 2016.

SOLANO, Cristina; ECHEVERZ, Maite; LASA, Iñigo. Biofilm dispersion and quorum sensing. **Current opinion in microbiology**, v. 18, p. 96-104, 2014.

SUN, Shujing et al. The metabolic flux regulation of *Klebsiella pneumoniae* based on quorum sensing system. **Scientific reports**, v. 6, 2016.

UROZ, Stephane; DESSAUX, Yves; OGER, Phil M. Quorum sensing and quorum quenching: the yin and yang of bacterial communication. **ChemBioChem**, v. 10, n. 2, p. 205-216, jan. 2009.

XAVIER, Joao B. et al. Monitorização e modelação da estrutura de biofilmes. **Boletim de Biotecnologia**, v. 76, n. 1, p. 2-13, 2003.

YANG, Haixia et al. Structure–Activity Relationship of Curcumin: Role of the Methoxy Group in Anti-inflammatory and Anticolitis Effects of Curcumin. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 65, p. 4509-4515. 2017.