

KLEWDMA DE FREITAS ARAÚJO

Efeito Sinérgico da β -lapachona em associação com antimicrobianos convencionais frente a *Pseudomonas aeruginosa* multirresistente e inibição de fatores de virulência: biofilme e piocianina.

RECIFE
2015

KLEWDMA DE FREITAS ARAÚJO

Efeito Sinérgico da β -lapachona em associação com antimicrobianos convencionais frente a *Pseudomonas aeruginosa* multirresistente e inibição de fatores de virulência: biofilme e piocianina.

“Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco, para obtenção do título de Mestre em Patologia”

ORIENTADORA: PROFESSORA EULÁLIA AZEVEDO XIMENES

RECIFE
2015

Ficha catalográfica elaborada pela
Bibliotecária: Mônica Uchôa, CRB4-1010

A663e Araújo, Klewdma de Freitas.
 Efeito sinérgico da β -lapachona em associação com antimicrobianos convencionais frente a *Pseudomonas aeruginosa* multirresistente e inibição de fatores de virulência: biofilme e piocianina / Klewdma de Freitas Araújo. – Recife: O autor, 2015.
 93 f.: il.; quad.; 30 cm.

 Orientadora: Eulália Azevedo Ximenes.
 Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco, CCS. Programa de Pós-Graduação em Patologia, 2015.
 Inclui referências.

 1. *Pseudomonas aeruginosa*. 2. β -lapachona. 3. Sinergismo. 4. Biofilme. 5. Piocianina. I. Ximenes, Eulália Azevedo (Orientadora). II. Título.

616.07 CDD (23.ed.) UFPE (CCS2015-100)

KLEWDMA DE FREITAS ARAÚJO

Efeito Sinérgico da β -lapachona em associação com antimicrobianos convencionais frente a *Pseudomonas aeruginosa* multirresistente e inibição de fatores de virulência: biofilme e piocianina.

Dissertação aprovada em: 13/02/2015

Profa. Dra. MÔNICA CAMELO PESSOA DE AZEVEDO ALBUQUERQUE
(Dep. de Medicina Tropical - UFPE)

Profa. Dra. MANUELA FIGUEIROA LYRA DE FREITAS (Dep. de Patologia - UFPE)

Profa. JOÁS LUCAS DA SILVA (Dep. de FÁRMACIA- UNESP/CAMPUS ARARAQUARA)

RECIFE
2015

Ao meu amado irmão Klaysson Araújo:
A saudade é sim minha eterna companheira, mas meu amor por
ti é maior, e a certeza do nosso reencontro me traz paz...

AGRADECIMENTOS

A Deus, por ser presente em cada momento de minha vida. Sempre orientando qual melhor caminho a seguir, e inspirando a conformação no meu coração de que tudo acontece no tempo certo e para o meu melhor.

Aos meus pais Edivaldo e Maria pelo apoio incondicional; a minha irmã Klewse Araújo por ser minha amada companheira de vida, e ao meu esposo Fernando Buarque pela paciência, compreensão e pela ajuda nos momentos mais tensos.

A secretária do Programa de Pós-Graduação em Patologia Margarete Valdevino, boa vontade em ajudar sempre.

As amigas do Programa de Pós-graduação em Patologia: Ana Paula, Almerinda Agrelli, Liane D'Oleron, Mirela Lima, Neyla Alves, Priscila Aragão, Zilma Anjos. Por representarem a parte doce do mestrado, obrigada pelos diversos momentos de conversas sérias e de descontração.

Aos amigos do laboratório de microbiologia: Fabio Aguiar pelo acolhimento inicial; Tacilene Silva por ser o equilíbrio para a minha agitação, e a Amanda Mesquita por me ensinar o que é ser verdadeiramente uma pessoa magnânima.

Ao chefe ULAB/HC Epitácio Villar, e as amigas da Sorologia Edneide Figueiroa, Cláudia Gouveia e Nadia Regina por permitirem as minhas ausências no trabalho.

Ao meu irmão do coração João Soares, pelo apoio e incentivo de sempre.

A minha amiga Andreia Silva, por dar o suporte que eu necessitava e cobrir minhas ausências no Laboratório de Olinda.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a elaboração deste trabalho.

“...Toda caminhada começa
no primeiro passo
a natureza não tem pressa
segue seu compasso
inexoravelmente chega lá...”
Flavio José

RESUMO

Pseudomonas aeruginosa é um patógeno oportunista responsável por infecções nosocomiais graves e que cada vez ganha destaque pelo desenvolvimento de multiressistência. O objetivo deste trabalho foi avaliar o sinergismo da β -lapachona com antimicrobianos convencionais e sua atividade sobre fatores de virulência. Inicialmente foram testadas dez cepas de *Pseudomonas aeruginosa* com fenótipo de resistência previamente definido. Destas, quatro cepas (LFBM 01, LFBM 02, LFBM 16, LFBM 18) apresentaram um perfil de resistência a ciprofloxacino, meropenem e cloridrato de cefepima e por essa razão foram selecionadas para este estudo. Para verificar o efeito sinérgico entre a β -lapachona e os agentes antimicrobianos, foi utilizado o método de *checkerboard*. Os critérios utilizados para avaliar a atividade sinérgica foram definidos pelo Índice da Concentração Inibitória Fracionada (FIC índice). A partir dos melhores valores do FIC índice das associações β -lapachona/antimicrobiano foram avaliadas a atividade destas sobre a produção de biofilme e piocianina. Os valores do FIC índice variaram de 0,12 a 0,50 indicando uma interação sinérgica para a maior parte das associações. O percentual de redução na formação do biofilme foi acima de 70% para todas as associações, exceto para β -lapachona/meropenem frente cepa LFBM 18. O percentual de redução na produção de piocianina variou de 89,% a 98,9% e de 36 a 69,9% para a associação da β -lapachona com cloridrato de cefepima e meropenem respectivamente.

Palavras chaves: *Pseudomonas aeruginosa*. β -lapachona. Sinergismo. Biofilme. Piocianin

ABSTRACT

Pseudomonas aeruginosa is an opportunistic pathogen responsible for serious nosocomial infections and that time is highlighted by the development of multi-resistance. The objective of this study was to evaluate the synergy of β -lapachone with conventional antimicrobial agents and their activity on virulence factors. Initially were assayed ten strains of *Pseudomonas aeruginosa* with predetermined resistance phenotype. Of these four strains (LFBM 01, LFBM 02, LFBM 16, LFBM 18) presented one to ciprofloxacin resistance profile, meropenem and cefepime hydrochloride and therefore were selected for this study. To verify the synergistic effect between the β -lapachone and antimicrobial agents, was used the checkerboard method. The criteria used to evaluate the synergistic activity were defined by the Index of Fractional Inhibitory Concentration (FIC index). From the top of the FIC index values for β -lapachone / associations antimicrobial activity of these were evaluated for the production of pyocyanin and biofilm. The FIC index values ranged from 0.12 to 0.50 indicating a synergistic interaction for most organizations. The percentage reduction in biofilm formation was above 70% for all associations, except for β -lapachone / meropenem front strain LFBM 18. The percentage reduction in pyocyanin production ranged from 89% to 98.9% and 36 to 69.9% for the association of β -lapachone with cefepime hydrochloride and meropenem respectively.

Key words: *Pseudomonas aeruginosa*. β -lapachone. Synergism. Biofilm. Pyocyanin

LISTA DE FIGURAS

Figura 1A Pili tipo IV <i>P. aeruginosa</i>	6
Figura 1B Extensão e retração Pili tipo IV em <i>P. aeruginosa</i>	6
Figura 2: Estrutura flagelar <i>P. aeruginosa</i>	7
Figura 3: Estrutura do LPS	9
Figura 4: Biossíntese do alginato <i>P. aeruginosa</i>	11
Figura 5: Regulação do Quorum Sensing <i>P. aeruginosa</i>	12
Figura 6: Estrutura sistema geral de secreção tipo III <i>P. aeruginosa</i>	15
Figura 7: Sistema de captação do Fe <i>P. aeruginosa</i> a esquerda inativo e a direita ativo.....	19
Figura 8: Etapas do desenvolvimento do biofilme	21
Figura 9: Biossíntese do sistema de sinalização de piocianina	22
Figura 10: Oxidação de NADP e NADPH pela piocianina.....	23
Figura 11: Estrutura da OprP	29
Figura 12: Esquema do mecanismo de ação de quinolonas, β -lactâmicos e aminoglicosídeos	31
Figura 13: A 1,4-benzoquinona; B 1,4-naftoquinona; C 9,10-antraquinona.....	32
Figura 14: Estrutura química do lapachol (1) e da β -lapachona (2)	33
Figura 15: Associação agente antimicrobiano/ β -lapachona mostrando um sinergismo total.	41

LISTA DE QUADROS

Quadro 1: Sistemas de efluxo e seus substratos	28
Quadro 2: Cepas de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> : origem e o perfil de resistência aos antimicrobianos.	38

SUMÁRIO

1. APRESENTAÇÃO.....	01
2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	04
2.1.1 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	04
2.1.2 Fatores de virulência de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	05
2.1.2.1 Fatores Morfológicos	05
2.1.2.2 Fatores secretados por <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	11
2.2. Mecanismos de resistência aos antibióticos.....	24
2.3 Mecanismos de ação dos antimicrobianos	29
2.4 β - lapachona	32
2.5 Associações farmacológicas.....	34
3. OBJETIVOS	37
3.1 Objetivo geral.....	37
3.2. Objetivos específicos	37
4. MATERIAIS E MÉTODOS	38
4.1. Microrganismo	38
4.1.2 Cultura, manutenção e padronização do inóculo	39
4.2 Agentes antimicrobianos.....	39
4.3 β -lapachona	40
4.4.1 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)	40
4.4.2 Determinação da Concentração Bactericida Mínima (CMB)	40
4.4.3 Determinação da Concentração Inibitória Fracionada (checkerboard)	41
4.5 Produção e inibição de biofilme.....	41
4.6 Produção e inibição da piocianina.....	42
5. Método de análise	43
6. ARTIGO	44
7. CONCLUSÕES.....	78
8. REFERÊNCIAS	79

1. APRESENTAÇÃO

A antibioticoterapia representou um avanço para o desenvolvimento da humanidade, a possibilidade de tratar doenças infecciosas contribuiu para os avanços da medicina, no entanto a falta de critérios na sua utilização tanto pela comunidade médica como pela população levou ao aparecimento de bactérias resistentes (Franco et al, 2009; Davies e Davies, 2010; Palmeira et al, 2010; Chanda e Rakholiya, 2011; Lago et al, 2012).

Os antibióticos exercem uma pressão seletiva nas populações bacterianas favorecendo o surgimento de microorganismos multidroga resistentes (MDR) (Marceau et al, 2013).

A multirresistência é definida como a falta de sensibilidade a vários antimicrobianos de classes diferentes e o seu crescente aumento tornou-se um grave problema de saúde pública em todo o mundo (Franco et al, 2009; Nikaido, 2009; Bassetti et al, 2013).

Associado a este problema, a falta de novas terapias tem preocupado as autoridades de saúde. Diante desta situação diversas instituições internacionais tais como a Organização Mundial de Saúde, o Centro Europeu de Prevenção e Controle, a Sociedade Americana de Doenças Infecciosas promovem ações conjuntas com as indústrias farmacêuticas, numa tentativa de estimular a pesquisa e o desenvolvimento de novos agentes antimicrobianos (Boucher et al, 2013).

As bactérias multirresistentes comumente isoladas, pertencem a um grupo denominado “ESKAPE”, assim designado por sua capacidade de escapar à ação antimicrobiana e apresentar variados mecanismos de patogênese, transmissão e resistência. Fazem parte desse grupo: *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Enterobacter sp* (Bassetti et al, 2013).

O grupo ESKAPE representa um desafio para a terapêutica antimicrobiana, as possibilidades de abordagem são reduzidas, e os custos de tratamento mais elevados (Franco et al, 2009; Davies e Davies, 2010).

Estima-se que o gasto anual de tratamento seja da ordem de 4,5 bilhões de dólares, o que representa custos em torno de 70% mais elevados quando comparados às infecções causadas por microorganismos não resistentes (Morales et al, 2012; Testa e Johnson, 2012).

Pseudomonas aeruginosa é um bacilo Gram-negativo, não-fermentador, de distribuição ubiqüitária, ou seja pode estar presente no ambiente ou fazendo parte da microbiota normal do ser humano e por essa razão serve como reservatório potencial de infecções (Deshmukh et al, 2013). Essa característica enquadra *Pseudomonas aeruginosa* como um microorganismo oportunista uma vez que raramente causa infecções em indivíduos saudáveis (Tomaras et al, 2013). Esta bactéria está comumente relacionada à infecções nosocomiais graves, muitas vezes fatais, especialmente em indivíduos imunocomprometidos (Viedma et al, 2012).

Gentamicina, amicacina, tobamicina, piperacilina, aztreonam, cefepima, meropenem, cefepima, ceftazidima, ciprofloxacino, levofloxacina, doripenem, imipenem, piperacilina-tazobactam, ofloxacina, norfloxacina, ticarciclina, e polimixina B são antimicrobianos recomendados para tratamento das infecções causadas por *Pseudomonas aeruginosa* (CLSI, 2013). Entretanto a polimixina B só é usada como última alternativa devido a sua alta toxicidade (Guimarães et al, 2010; Neves et al, 2011).

A pesquisa para o desenvolvimento de novos antimicrobianos clinicamente mais seguros é o objetivo de estudo de vários cientistas em todo o mundo (Rodrigues et al, 2012; Costa et al, 2013).

Algas marinhas, fungos e especialmente extratos de plantas são estudados como fontes de compostos biologicamente ativos (Guimarães et al, 2010; Palmeira et al, 2010; Elaissi et al, 2012). Metabólitos secundários, produzidos por vegetais superiores são fontes primárias de moléculas bioativas, principalmente àquelas com potencial microbicida (Noumedem et al, 2013).

Dentre os diversos metabólitos secundários a β -lapachona, classificada como uma naftoquinona vem sendo alvo de diversos estudos por suas propriedades biológicas, sejam elas: antifúngicas, antivirais, antitumorais, antiparasitárias e antibacterianas (Ferreira e Souza, 2003; Antunes et al, 2006; Silva et al, 2009; Macedo et al, 2013).

Desta forma este trabalho objetiva uma avaliação de antimicrobianos em associação com a β -lapachona frente à cepas de *Pseudomonas aeruginosa* multidroga resistentes e a atividade destas associações sobre a formação de biofilme e a produção de piocianina.

2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

A extensa utilização de antimicrobianos no ambiente hospitalar, favorece o aumento da resistência bacteriana, a disseminação desses patógenos é facilitada pela presença de indivíduos imunocomprometidos ou que realizaram procedimentos invasivos os quais apresentam uma maior probabilidade de serem contaminados (Nogueira et al, 2009). A vulnerabilidade e a presença de bactérias resistentes induz o surgimento de infecções nosocomiais graves que elevam a relação morbidade/mortalidade (Nangino, 2012).

Pseudomonas aeruginosa é responsável por cerca de 10% das infecções hospitalares registradas (Figueiredo et al, 2007; Morales et al, 2012). É agente causal de infecções agudas oportunistas da pele e tecidos moles ou crônicas como infecções cirúrgicas, oculares, do trato urogenital, sepse, pneumonia nosocomial em entubados, como também tem uma importante participação no progressivo comprometimento pulmonar em pacientes com fibrose cística (Tielen et al, 2010; Heimer et al, 2013; Melzer e Welch, 2013; Wargo, 2013).

2.1.1 *Pseudomonas aeruginosa*

Pseudomonas aeruginosa é um bastonete Gram-negativo, não esporulado, móvel contendo um único flagelo polar simples, embora algumas cepas possam apresentar dois ou três flagelos. A sua membrana externa é composta por proteínas e como todos os Gram-negativos por lipopolissacarídeo e fosfolipídios (Liang et al, 2011).

São bactérias aeróbias, porém dependendo das circunstâncias ambientais podem crescer anaerobicamente na presença de nitrato como aceptor de elétrons e em meios de cultura contendo somente acetato como fonte de carbono e sulfato de amônio como fonte de nitrogênio num processo chamado de desnitrificação (Arai 2011; Toyofuku et al, 2012).

A versatilidade nutricional deste microorganismo faz com que persista por longos períodos em ambientes adversos e apresente uma ampla distribuição seja no solo, água, fazendo parte da microbiota normal dos indivíduos, resíduos de sabão, superfícies de materiais cirúrgicos e até mesmo em alguns antissépticos (Balasubramanian et al, 2013).

A patogênese de *Pseudomonas aeruginosa* está associada a uma falha nos mecanismos de defesa do hospedeiro como imunodepressão oriunda de falhas das

barreiras cutâneas ou mucosas provocadas por queimaduras, cirurgias bem como da presença de diversos fatores de virulência responsáveis por colonização no hospedeiro (Liang et al, 2011; Tomaras et al, 2013).

Os mecanismos de virulência de *Pseudomonas aeruginosa* compreendem tanto componentes morfológicos como pili, flagelos, lipopolissacarídeo, alginato como compostos secretados: exotoxinas, proteases, elastases, pigmentos e polissacarídeos extracelulares que são responsáveis por danos teciduais e favorecem a lise celular e a sua disseminação na corrente sanguínea (Balasubramanian et al, 2013; Tomaras et al, 2013).

2.1.2 Fatores de virulência de *Pseudomonas aeruginosa*

2.1.2.1 Fatores Morfológicos

Fímbrias ou Pili

O Pili de *Pseudomonas aeruginosa* é formado principalmente por um conjunto de quatro subunidades de pilina também conhecido como pili tipo IV. Esse sistema polimérico é capaz de mediar diversas funções celulares, tais como: motilidade, participação na formação do biofilme, adesão, incorporação de DNA durante a conjugação contribuindo dessa forma para a formação dos genomas bacterianos e evasão do sistema imunológico (Giltner et al, 2012).

O Pili tipo IV é montado numa estrutura helicoidal, com regiões de aminoácidos altamente conservadas e regiões menos conservadas. A porção conservada é o domínio hidrofóbico N-terminal e constitui o núcleo central da estrutura, sendo responsável pela organização das fibras de pilina durante os processos de montagem/desmontagem, proporcionando extrema resistência mecânica (Karupiah e Derrick, 2011; Giltner et al, 2012).

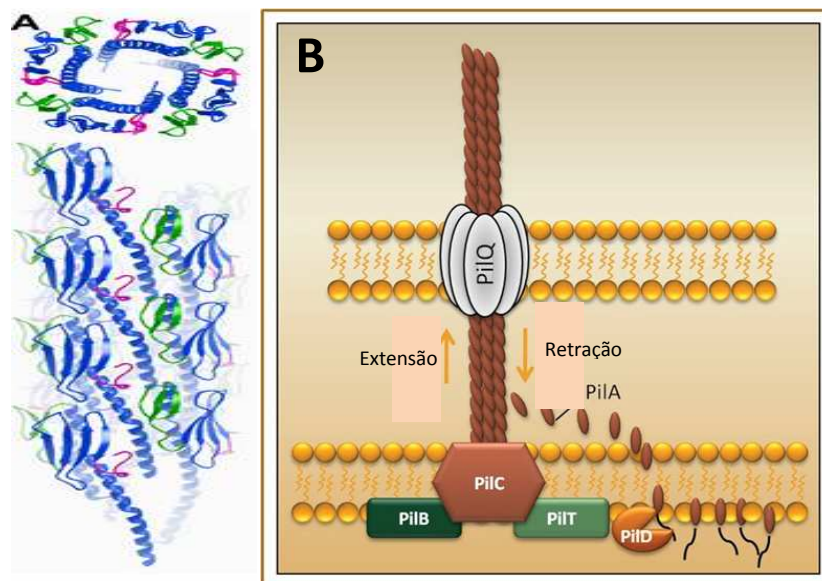
A porção anfipática C-terminal é menos conservada e apresenta uma variabilidade funcional que altera continuamente a antigenicidade dessa região, dificultando o reconhecimento pelo sistema imunológico do hospedeiro (Giltner et al, 2012).

No papel de adesina, promove a ligação da bactéria às células hospedeiras por meio de interações com receptores glicopeptídeos GM-1 e GM-2 presentes na superfície das células. Iniciando assim, o processo de colonização (Karupiah e Derrick, 2011; Giltner et al, 2012).

Pseudomonas aeruginosa também usa o Pili como mecanismo de locomoção através de sucessivos ciclos de extensão e retração os quais são dependentes de ATP e ATPases hexaméricas. Após à hidrólise do ATP, energia química é transformada em energia mecânica, e o pilus sofre mudanças conformacionais que resultam num processo de polimerização reversível de proteínas formando um complexo sistema de montagem e desmontagem das fibras helicoidais também conhecido por espasmos de motilidade (Jin et al, 2011; Karuppiah e Derrick , 2011; Giltner et al, 2012).

A participação do Pili na formação do biofilme começa com a adesão inicial seja em superfícies sólidas ou nas células do hospedeiro, e através dos espasmos de motilidade promove a remodelação do biofilme (Giltner et al, 2012).

Figura 1: **A** Pili tipo IV *P. aeruginosa* (www.sfu.ca/mbb/faculty/craig/Background.htm) acessado em 01/10/2014; **B** Extensão e retração do Pili tipo IV em *P. aeruginosa* (journal.frontiersin.org/Journal/10.3389/fmicb.2011.00029/full), acessado em 01/10/2014



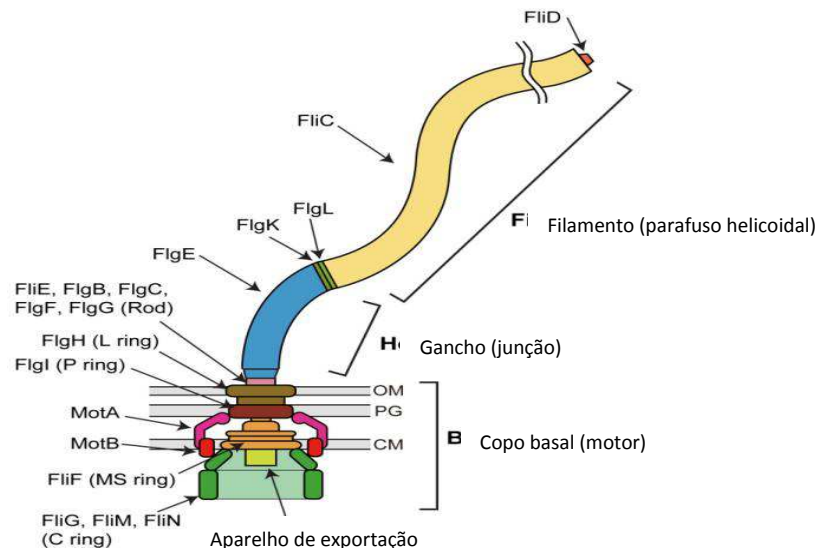
Flagelo

Pseudomonas aeruginosa, apresenta um flagelo polar que possibilita a bactéria se locomover, a unidade estrutural é a flagelina uma proteína com caráter adesivo que permite ligação com superfícies inertes ou com as células epiteliais (Tran et al, 2011).

A motilidade flagelar é um processo com grande gasto de energia e envolve a expressão de mais de 40 genes que codificam proteínas reguladoras, componentes

estruturais do aparelho de secreção flagelar e montagem, proteínas envolvidas na geração da força de rotação do motor e o mecanismo que controla a quimiotaxia flagelar quando a bactéria se move em direção a um ambiente mais favorável (Amiel et al, 2010). O flagelo pode ser dividido em três partes: o corpo basal incorporado à membrana celular (motor rotativo), o gancho (estrutura intermediária que transfere a força do motor para o filamento) e o filamento responsável por produzir o impulso (Morimoto e Minamino, 2014). Este sistema fornece energia para o binário de rotação de um filamento helicoidal das subunidades de repetição de flagelina que funcionam como uma hélice (Amiel et al, 2010).

Figura 2: Estrutura flagelar *P. aeruginosa* (Morimoto e Minamino, 2014)



O motor flagelar é formado por um rotor e estatores, o rotor é um múltiplo complexo constituído por quatro proteínas flagelares: FliF, Flig, Flim e Flin. Este motor funciona como um interruptor molecular, determinando a rotação no sentido horário ou anti-horário (Amiel et al, 2010; Morimoto e Minamino, 2014). A proteína Flin interage com os componentes do sistema de secreção tipo III, facilitando a montagem e auxilia na entrega de subunidades de proteínas constituintes das partes exteriores da estrutura (gancho e filamento) (Paul et al, 2011).

A segunda estrutura é o estator (espécie de componente estacionário onde o motor roda) formado por quatro proteínas de membrana integrais MotAB e MotCD, ancoradas ao peptidoglicano (Amiel et al, 2010). A energia produzida pelas interações

entre MotAB e Flig gera a força motriz necessária para o sistema (Morimoto e Minamino, 2014).

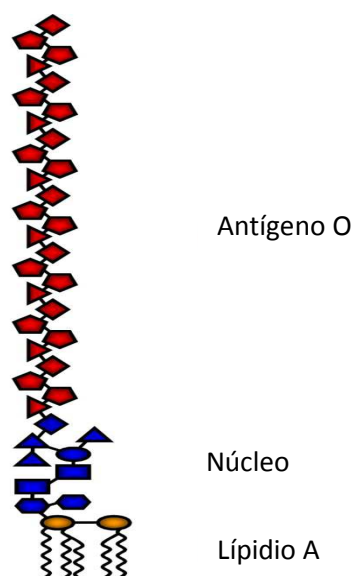
A flagelina, codificada pelo gene *fliC* é o principal componente proteico do filamento flagelar (Campodónico, et al, 2010). A flagelina além de ser parte constituinte do flagelo auxiliando na motilidade, tem a característica de ser imunogênica, ou seja, quando ligada ao receptor Toll-Like Cell cinco presente na superfície celular estimula o sistema imunológico através da indução da liberação de citocinas, especialmente a interleucina 8 (IL-8) que atrai e ativa polimorfonucleares (Mizel e Bates, 2010; Bucior et al, 2012; Pichert et al, 2012; Parker e Prince, 2013).

A perda da flagelina ou sua expressão modificada através de uma mutação facilita a evasão fagocítica do sistema imunológico pela bactéria resultando num aumento da população bacteriana (Lovewell et al, 2011).

Lipopolissacarídeo (LPS)

É o principal composto presente na membrana externa de bactérias Gram-negativas, responsável pelas interações com o meio externo e com os receptores da célula hospedeira. Estruturalmente é formado por três regiões definidas: o lipídeo A que é o componente tóxico de LPS, formado por uma porção hidrofóbica composta por dissacarídeos ligados aos ácidos graxos de cadeia curta e grupos fosfatos; o cerne constituído por sequências não repetidas de oligossacarídeos, e subdividido em partes interna e externa; e antígeno ``O ou S´´ que é a região hidrofílica constituída por oligossacarídeos (Huang et al, 2012; Chiku et al, 2013). As fortes ligações entre os grupos fosfatos e os oligossacarídeos são responsáveis pela estabilidade da membrana (Straatsma e Soares, 2009).

Figura 3: Lipopolissacarídeo *P. aeruginosa* (<http://commons.wikimedia.org/wiki/File:LPS.jpg>)
acessado em 08/10/2014



Após a lise da célula bacteriana e liberação de LPS ocorre uma forte resposta imunológica, isto acontece através de uma interação do LPS com receptores Toll-like quatro e co-receptores (MD-2,CD14) presentes na superfície de macrófagos e neutrófilos. Após esta interação ocorre o estímulo das vias transdutoras de sinal, culminando com a produção de citocinas inflamatórias tais como interleucinas 1, 2 e 6, fator de necrose tumoral, interferon, e proteínas de fase aguda. Se a quantidade de LPS liberada for grande, ocorre uma super estimulação do sistema imunológico com liberação excessiva de mediadores inflamatórios, podendo levar ao choque séptico (Huang et al, 2012).

Alginate

O alginato é um polissacarídeo de elevado peso molecular constituído da síntese de D-resíduos do ácido manurônico unidos por ligações glicosídicas, (Franklin et al, 2011; Riley et al, 2013).

A produção do alginato é geneticamente regulada, dentre os vários genes participantes deste processo, destaca-se o gene *Algu* também conhecido como fator sigma, responsável pela transcrição de *algD* (Yin et al, 2013).

Doze proteínas envolvidas na biossíntese, modificação e exportação do alginato são codificados pelo operon *AlgD* (*algD*, *alg8*, *alg44*, *algK*, *Alge*, *algG*, *algX*, *algL*, *ALGI*, *algJ*, *algF*, *alga*), outras proteínas necessárias ao processo de síntese do alginato, entre elas a *AlgC*, são codificadas em outra parte do genoma (Rehman et al, 2013; Okkotsu et al, 2014).

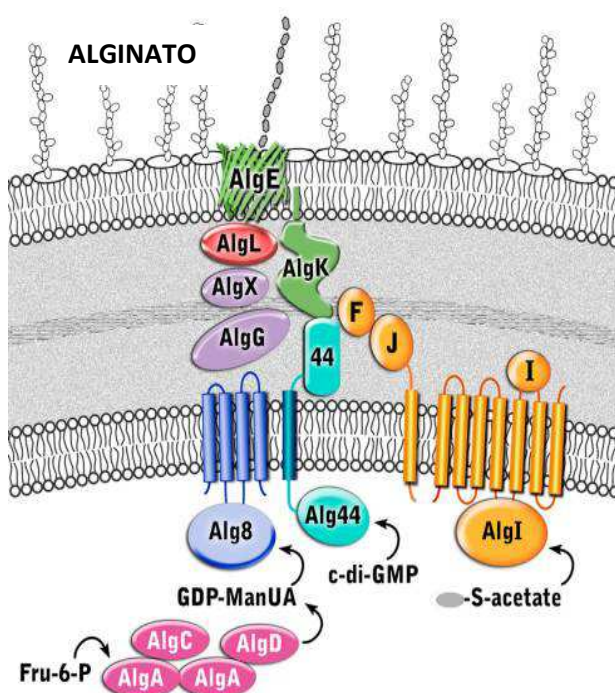
A síntese do alginato forma um gel em torno da bactéria, formando uma barreira protetora e possibilitando que as colônias tomem uma característica mucóide (Huang et al, 2012; Okkotsu et al, 2014). Uma superexpressão está relacionada com maior adesão; aumento da resistência à fagocitose e alta tolerância aos anticorpos (Balasubramanian et al, 2013; Yin et al, 2013).

A superprodução de alginato pode ser estimulada por diversos fatores que ativam a transcrição de *algD* como alta osmolaridade, diminuição de fosfato/ferro e perturbação da membrana induzida por etanol, assim como eventos proteolíticos induzidos por estresse de membrana (Damron et al, 2013; Yin et al, 2013).

Esses eventos induzem a superprodução de alginato a nível de pós-tradução, a outra forma de superprodução de alginato é a nível genético por mutações cromossômicas que desregulam sua produção, é comum nas infecções crônicas a expressão do fenótipo mutado com elevada produção de alginato (Okkotsu et al, 2014).

O controle negativo de sua produção é realizado pela proteína transmembrana MucA cuja porção C-terminal está localizada no periplasma e a N-terminal no citoplasma, seu mecanismo de ação consiste em sequestrar o fator sigma para o interior da membrana (Damron et al, 2013; Yin et al, 2013). Outras proteínas também desempenham um papel de reguladores negativos: MucB que interage com o a porção C-terminal de MucA, protegendo-a da degradação proteolítica; e MucD que é uma serina protease cuja função é a manutenção da estabilidade do periplasma através da degradação de proteínas deformadas (Damron et al, 2013).

Figura 4: Biossíntese do alginato *P. aeruginosa* (Franklin et al, 2011)



2.1.2.2 Fatores secretados por *Pseudomonas aeruginosa*

Pseudomonas aeruginosa utiliza um sistema de comunicação chamado de *quorum sensing* (QS), através do qual as células bacterianas realizam a comunicação entre si, por meio da difusão de pequenas moléculas sinalizadoras também conhecidas como auto-indutoras. Este processo acontece devido a capacidade das bactérias em detectar a densidade celular local e coordenar comportamentos de grupo (Tomaras et al, 2013). Partindo deste sistema de comunicação os microorganismos patogênicos regulam a expressão dos seus fatores de virulência de forma organizada, facilitando sua sobrevivência no ambiente ou no organismo hospedeiro (Jimenez et al, 2012; Balasubramanian et al, 2013).

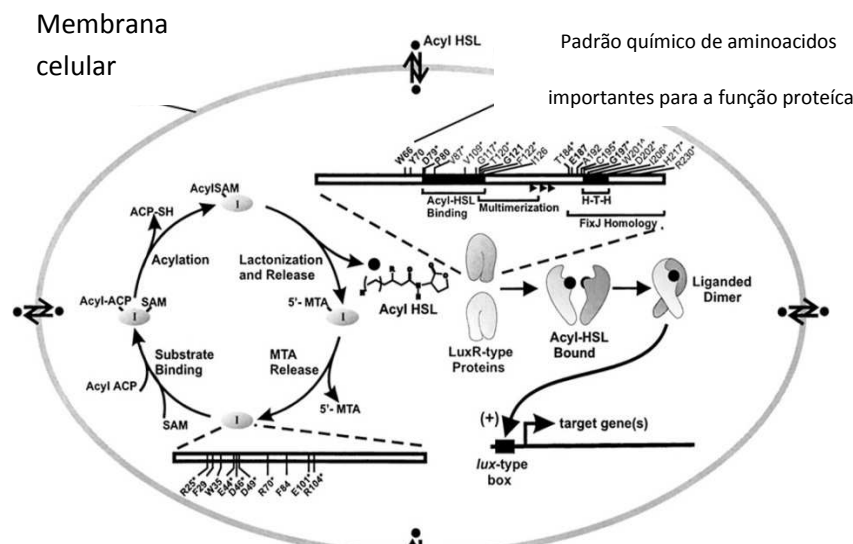
O primeiro sistema de sinalização de *quorum sensing* descrito foi o Lux, que envolve a participação do auto-indutor tipo LuxI e da proteína ativadora LuxR (R-proteína). Com o aumento da densidade celular bacteriana, aumenta também a concentração intracelular do auto-indutor *N*-acil-homo-serina lactona (AHLs), uma molécula anfipática formada por um domínio polar anel lactona da homoserina e outro apolar cadeia lateral de ácido graxos (Shrout, J. et al, 2011; Jimenez et al, 2012). A natureza anfipática das moléculas de AHLs facilita sua difusão no ambiente aquoso celular, como também através da bicamada fosfolipídica das membranas celulares (Shrout, J. et al, 2011).

P. aeruginosa apresenta dois sistemas auto-indutores AHLs: o Las e o Rhl. Las é produzido pela síntese do gene *lasI* e reconhecido pelo regulador de transcrição LasR, induzindo a secreção de *N*-3-oxo-dodecanoil homoserina lactona (3-oxo-C₁₂-HSL). O Rhl tem sua síntese controlada pelo gene *rhlI*, seu regulador de transcrição é o RhlR e sintetiza *N*-butanoil homoserina lactona (C₄-HSL), sua ativação é posterior ao sistema LasR (Reis et al, 2011; Jimenez et al, 2012).

A presença dessas moléculas induz a expressão de vários fatores de virulência como elastases, exotoxinas; estimula a produção de ramnolípido e piocianina e biosíntese e montagem do sistema de secreção de toxinas tipo III (Jimenez et al, 2012).

Um terceiro sistema auto-indutor de *quorum sensing* é o *Pseudomonas* quinolona sinalizador (PQS) regulado por genes *pqs* da biossíntese *pqsABCD* que sintetizam a molécula precursora 2-heptil-3-hidroxi-4-quinolona a partir de antranilato e ácido graxo. PQS se liga ao seu receptor PqsR e regula o sistema de auto-indução coordenando também a expressão de fatores de virulência especialmente a piocianina (Jimenez et al, 2012).

Figura 5: Regulação do *Quorum Sensing* *P. aeruginosa* (Shrout et al, 2011)



O *quorum sensing* (QS) também regula o sistema geral de secreção tipo III (SSTIII), que é o grande responsável pela secreção dos fatores de virulência da *Pseudomonas aeruginosa* (Bleves et al, 2005). O SSTIII consiste num sistema macromolecular formado por diversas proteínas ancorado na membrana plasmática bacteriana. Quando ativado pelo contato com a célula hospedeira este sistema é liberado, atravessa toda a estrutura da célula bacteriana até a membrana da célula hospedeira e aí libera suas toxinas (exoenzimas, proteases, elastase, fosfolipase) (Galle et al, 2012). Sua indução acontece tanto pelo contato com a célula hospedeira como por baixas concentrações do íon cálcio (Bleves et al, 2005).

SSTIII é constituído por um corpo basal, onde está ancorado uma estrutura em forma de agulha ou injectisoma o qual é estruturado por uma polimerização helicoidal de proteínas, e responsável por introduzir as toxinas secretadas na célula hospedeira (Veesenmeyer et al, 2009; Galle et al, 2012).

A montagem de um injectosoma funcional ocorre por meio da organização de proteínas: POPB e POPD proteínas hidrofóbicas responsáveis por promover a oligomerização do poro de translocação através do qual as proteínas efetoras são injetadas; a proteína PcrV hidrófila não integra propriamente o poro, porém sua presença é necessária para a formação de poros de translocação efetivos (Veesenmeyer et al, 2009; Galle et al, 2012).

O SSTIII também é composto por pequenas proteínas citosólicas, as chaperonas, divididas em três classes com funções distintas: classe I regula a formação de poros; classe II atua nas subunidades da estrutura em forma de agulha e classe III é adjuvante das toxinas efetoras (Galle et al, 2012). O sistema de chaperonas funciona como um autoregulador, inibindo a secreção inapropriada das toxinas ainda no ambiente bacteriano, o que seria fatal para o microorganismo e facilitando a secreção destas para fora da célula bacteriana (Galle et al, 2012).

Quatro toxinas efetoras foram identificadas em *P. aeruginosa*: Exos, Exot, ExoU e ExoY, raramente todas serão expressas numa mesma estirpe, mas Exos parece ser comum em associação com as demais. A expressão destas toxinas tem relação com o aumento do dano tecidual, proliferação bacteriana, cicatrização retardada e agravamento da evolução clínica das infecções causadas por este microorganismo (Veesenmeyer et al, 2009; Galle et al, 2012).

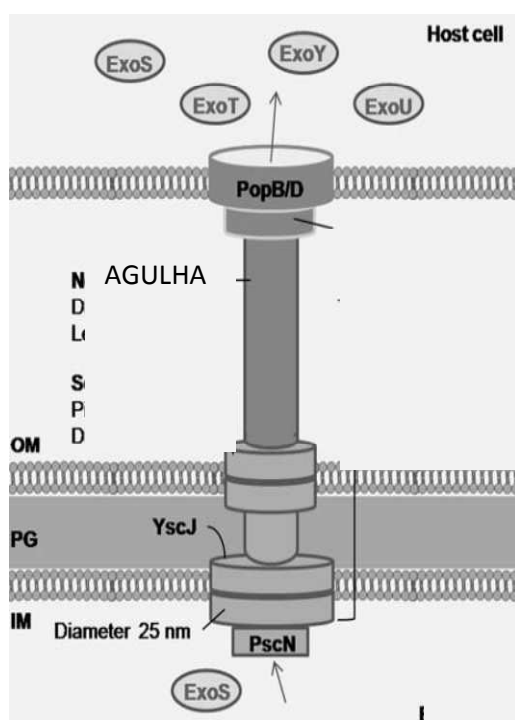
Exos e Exot são proteínas que apresentam uma GTPase com domínio de ativação N-terminal que codifica o complexo protéico RhoGTPase (RhoGAP) e um domínio de adenosina difosfato C-terminal ribosiltransferase (domínio-ADPRT) os quais catalisam a transferência de ADP (adenosina difosfato) às proteínas transdutoras de sinal como a RAS. Ambas são formadas por uma longa cadeia de aminoácidos, onde os resíduos N-terminais constituem os domínios de secreção, de ligação com as chaperonas e de localização da membrana. Essas toxinas trabalham em conjunto inativando as GTPases e diminuindo a síntese de DNA dessa forma a célula hospedeira tem seu citoesqueleto de actina desestruturado, e a célula é induzida a morte por apoptose (Veesenmeyer et al, 2009; Galle et al, 2012).

ExoU é a toxina mais virulenta, constituída pelos aminoácidos serina e asparagina, apresenta três domínios na porção N-terminal (Galle et al, 2012). Após sua interação com a enzima superóxido dismutase na célula hospedeira ativa a via da fosfolipase A2, gerando uma forte atividade pró-inflamatória com grande produção de ácido araquidônico, resultando numa secreção exacerbada de prostaglandinas que promovem uma intensa inflamação com elevado dano tecidual e lise celular (Veesenmeyer et al, 2009).

ExoY é uma adenilciclase solúvel, apresenta dois domínios que atuam em conjunto, sua secreção aumenta os níveis de AMPc citoplasmáticos, induz a hiperfosforilação da proteína Tau que tende a se agregar, altera a estabilidade dos filamentos de microtúbulos, induz a formação de espaços inter-endoteliais e aumenta a permeabilidade vascular no tecido pulmonar (Galle et al, 2012; Ochoa et al, 2012).

A expressão e liberação de exoenzimas promove danos teciduais locais, facilita a disseminação da bactéria e infecção sistêmica, além de induzir a uma cicatrização retardada (Galle et al, 2012).

Figura 6: Estrutura sistema geral de secreção tipo III *P. aeruginosa* (Galle et al, 2012)



Exotoxina A

É a proteína mais tóxica e com maior relação com a virulência da bactéria, excretada como um único polipeptídeo tóxico (Davini et al, 2009; Morlon-Guyot et al, 2009).

Constituída por três domínios estruturais: domínio I – porção amino-terminal que interage com o receptor da célula eucariótica; domínio II - porção do meio que facilita o transporte através da membrana da célula eucariótica; domínio III – porção carboxi-terminal onde se localiza o sítio enzimaticamente ativo (Morlon-Guyot et al, 2009; Tanom et al, 2013).

A toxina penetra na célula hospedeira através de um processo de endocitose mediado pela ligação do domínio I com o receptor na célula hospedeira, transloca-se para o citoplasma da célula, onde a exposição a um baixo pH promove mudanças conformacionais dentro do endossoma pela ativação dos domínios II e III induzindo a ribosilação do ADP (adenosina difosfato) inativando assim o fator de alongamento E2F, dessa forma a síntese proteica é inibida com consequente morte celular. A exotoxina A também é responsável por danos teciduais locais e invasão bacteriana, assim como contribui para a inibição da resposta imunológica do hospedeiro (Tanom et al, 2013).

O alto teor de ferro presente no meio é um regulador negativo da produção da exotoxina A (Davini et al, 2009).

Proteases

Várias enzimas proteolíticas são secretadas por *Pseudomonas aeruginosa*, que atuam em conjunto degradando componentes teciduais e do sistema imunológico do hospedeiro, este fato aumenta sua patogênese e facilita a disseminação (Andrejko e Dudka, 2012; Andrejko et al, 2013).

A elastase A, codificada pelo gene *lasA* é uma metaloproteinase de aproximadamente 22 kDa, pertencente a família β -lítica é também conhecida por estafilolisina por lisar *Staphylococcus aureus* pela clivagem da ligação da pentaglicina com o peptidoglicano. Esta enzima também é responsável por clivar as ligações peptídicas Gli-Gli presentes na elastina, a proteína constituinte dos vasos sanguíneos (Andrejko et al, 2013).

A elastase B é codificada pelo gene *lasB* também chamada de pseudolisina, é uma endopeptidase de 33 kDa pertencente a família termolisina, apresenta o íon zinco no seu sítio ativo. Promove a hidrólise dos componentes da matriz extracelular danificando os tecidos do hospedeiro. A ação da elastase B provoca danos nos tecidos e inflamação persistente pois, degrada fibrina e colágeno além de proteínas do complemento, imunoglobulinas A e G, lisozimas presentes nas células das vias aéreas e proteínas surfactantes protetoras da mucosa pulmonar (Kuang et al, 2011; Andrejko e Dudka, 2012; Garner et al, 2012; Andrejko et al, 2013).

Esta enzima também participa da formação do biofilme, facilitando a colonização e invasão por *P. aeruginosa* (Garner et al, 2012).

A protease alcalina, codificada pelo gene *apra* é também uma metaloprotease, com 56 kDa envolvida na lise da caseína, fator de necrose tumoral, componentes do sistema complemento, inibidor de proteinase- α 1, interferon gama e metaloproteinases da matriz celular (Andrejko et al, 2013).

A protease IV é uma endoprotease de serina com peso molecular 26 kDa, cliva especificamente substratos da porção carboxila dos resíduos de lisina. Também participa da degradação de elementos do sistema complemento, fibrinogênio, plasminogênio e imunoglobulinas (Andrejko et al, 2013).

Ramnolipídio (Rhl)

São glicolípidios extracelulares constituídos por um fragmento de ácido graxo hidrofóbico e duas moléculas hidrofílicas de L-ramnose, essa porção possibilita a *P. aeruginosa* utilizar diversas fontes de carbono, tais como os alcanos (Morris et al, 2011; Bazire e Dufour, 2014).

Ramnolipídios apresentam propriedades tenso-ativas e atuam como agentes de solubilização degradando o surfactante pulmonar, participam no processo de assimilação de substratos insolúveis principalmente hidrocarbonetos, alteram a hidrofobicidade celular e a motilidade de superfície interferindo na função ciliar traqueal. Também tem participação na formação do biofilme, inibição da fagocitose e ainda atuam como hemolisinas (Reis et al, 2011; Bazire e Dufour, 2014).

Contribui para a motilidade, funcionando como um agente de molhagem reduzindo a tensão superficial e facilitando o deslocamento bacteriano (Glick et al, 2010). Seu envolvimento na formação do biofilme funciona como um fator de virulência sobre dois aspectos: o primeiro é na inicialização do biofilme atuando como um agente protetor contra outras espécies microbianas, e o segundo é quando esse biofilme está bem desenvolvido e o microambiente começa a sofrer com o esgotamento de nutrientes, sendo necessário uma ruptura controlada dessa estrutura pela formação de cavidades por onde sairão células isoladas ou aglomerados de microorganismos (Chrzanowski et al, 2012).

A produção de ramnolipídio é estimulada por níveis elevados de nitrato, glutamato e aspartato. E situações nas quais as fontes de nitrogênio e fósforo estão limitadas, neste caso aumento da síntese de ramnolipídio acontece pela necessidade de motilidade para a busca de fontes ricas em nutrientes (Reis et al, 2011; Chrzanowski et al, 2012).

Ramnolipídios tem aplicações industriais pelo seu papel como biorremediadores. A liberação de ramnolipídios leva a hidrólise de compostos hidrofóbicos como por exemplo os hidrocarbonetos, além de interferir na hidrofobicidade de outras espécies de microorganismos contribuindo nos processos de biodegradação (Chrzanowski et al, 2012).

Fosfolipase C (Plc)

Pseudomonas aeruginosa produz quatro tipos de fosfolipases C: Plc A e Plc B não hemolíticas e zinco dependentes com funções biológicas ainda não muito bem esclarecidas, embora a Plc B pareça ter afinidade por fosfolipídios constituintes do surfactante pulmonar (Truan et al, 2013).

A forma hemolítica da fosfolipase C é co-expressa por duas proteínas sobrepostas, que atuam como co-chaperonas formando heterodomínios complexos secretados para o meio extracelular. Atuando sobre a esfingomielina e a fosfatidilcolina principais constituintes do surfactante pulmonar com consequente liberação de ceramida e diacilglicerol respectivamente. A ceramida é pró-apoptótica e o diacilglicerol induz a resposta proliferativa das células eucarióticas (Alonso et al, 2011; Hogan et al, 2011; Sot et al, 2013; Truan et al, 2013).

Sideróforos

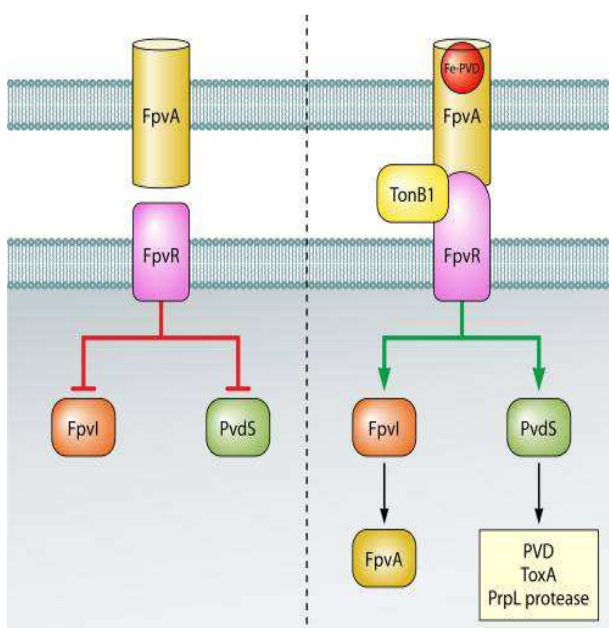
As bactérias necessitam de ferro para o seu crescimento e sobrevivência, porém em concentração regulada, pois o excesso deste elemento leva ao estresse oxidativo grave com formação de espécies reativas de oxigênio (EROs) e a sua carência limita o crescimento microbiano. A homeostase deste íon é mantida por proteínas de reserva e por um sistema de tamponamento (Balasubramanian et al, 2013; Romsang et al, 2014). As concentrações intracelulares de ferro também influenciam na expressão de vários fatores de virulência (Jimenez et al, 2012).

O ferro disponível no ambiente está na sua forma insolúvel, e no hospedeiro está complexado em proteínas como lactoferrina, hemoglobina, transferrina. Para a absorção *Pseudomonas aeruginosa* utiliza estruturas chamadas de sideróforos que são quelantes de ferro responsáveis por sua internalização, através de receptores de membrana externa específicos que regulam a entrada destas moléculas na célula bacteriana (Balasubramanian et al, 2013; Cornelis e Dingemans, 2013; Tomaras et al, 2013).

De acordo como o ferro é absorvido, os sideróforos são classificados em diferentes tipos: fenolato, catecolato, hidroxamato, carboxilato ou misto (Cornelis e Dingemans, 2013).

A pioverdina é um pigmento que também participa na absorção do ferro, tem sua síntese aumentada nas baixas concentrações deste íon, sendo classificada como um sideróforo misto composto por uma cadeia de peptídeo variável e um cromóforo (catecolato) (Cornelis e Dingemans, 2013).

Figura 7: Sistema de captação do Fe pela *P. aeruginosa*: a esquerda inativo e a direita ativo (Jimenez et al, 2012).



Biofilme

Biofilmes são comunidades multicelulares altamente complexas, onde as bactérias estão em associação célula a célula e incorporadas numa matriz polimérica extracelular o que facilita a adesão. São constituídos por proteínas, polissacarídeos (o alginato é o mais expressivo; Pel e Psl são ricos em glicose e manose respectivamente), ácidos nucleicos ou combinações destas macromoléculas (Chrzanowski et al, 2012; Hwang-Soo Joo e Otto, 2012; Balasubramanian et al, 2013; Okkotsu et al, 2014). A formação do biofilme é um processo multifatorial que envolve sinais ambientais e redes regulatórias (Wei e Ma, 2013).

Para o estabelecimento do biofilme a bactéria percebe o microambiente ao seu redor, ocorre uma alteração nas atividades enzimáticas estimulando a síntese de adesinas e expolissacarídeos, é o primeiro passo para a mudança de um modo plactônico para um modo de crescimento associado a um biofilme (Wei e Ma, 2013).

Os biofilmes podem ser formados em qualquer tipo de superfície (bióticas e abióticas), num processo de múltiplas etapas: ligação inicial; formação de uma monocamada bacteriana que vai maturando e formando uma estrutura mais complexa e organizada, regulada pela expressão de vários genes que coordenam os diversos processos celulares necessários a sobrevivência dos microorganismos patogênicos; a

última etapa de um biofilme é a dispersão de parte dessa estrutura (Balasubramanian et al, 2013; Okkotsu et al, 2014).

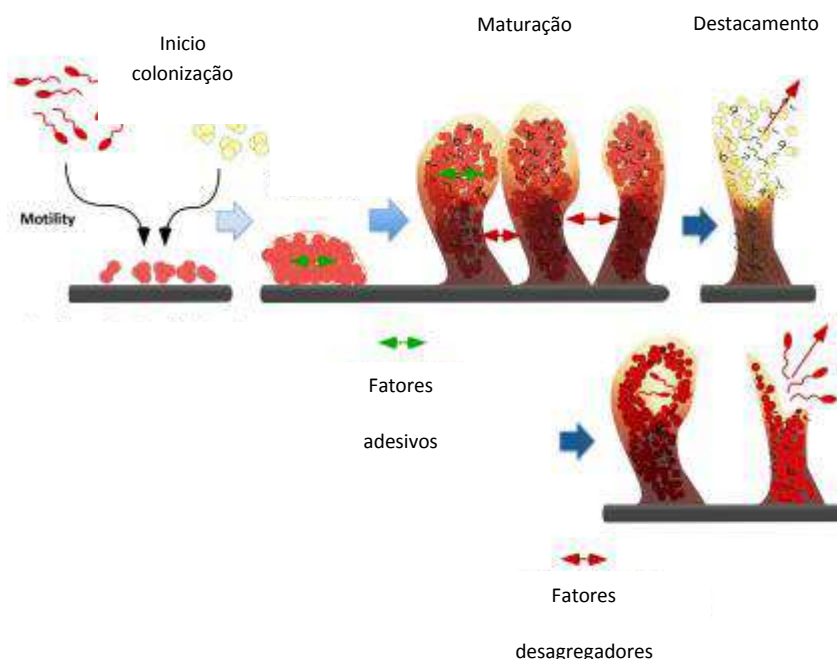
O estabelecimento de biofilmes aumenta a cooperação metabólica entre as bactérias, intensificando a comunicação intracelular e os processos de transferência horizontal de genes, aumentando a diversidade genética e as chances de sobrevivência, além de aumentar a resistência aos antimicrobianos e promover um escape do sistema imunológico (Okkotsu et al, 2014).

A dispersão do biofilme acontece quando o microambiente tende ao esgotamento dos nutrientes ou durante a disseminação da infecção, acredita-se que esse processo tenha início com o aumento da motilidade via ramnolipídio e Pili, parte da estrutura é rompida e algumas células se dispersam (Hwang-Soo Joo e Otto, 2012).

Outros fatores de virulência secretados por *Pseudomonas aeruginosa* ajudam na formação do biofilme. O *quorum sensing* é o grande responsável por coordenar a expressão de genes que permitem o estabelecimento e a manutenção; o Pili está envolvido na formação inicial da microcolônia; ramnolipídios são responsáveis por manter os canais de transporte dos nutrientes que irão abastecer este complexo (Shrout et al, 2011; Chrzanowski et al, 2012; Okkotsu et al, 2014).

A matriz do biofilme pode representar uma barreira para a difusão dos antimicrobianos aumentando assim a resistência, bem como dificultando o reconhecimento das bactérias pelos fagócitos (Hwang-Soo Joo e Otto, 2012). Portanto a formação de biofilme está associada ao mau prognóstico nas infecções causadas por *P. aeruginosa* (Breidenstein et al, 2012).

Figura 8: Etapas do desenvolvimento do biofilme (Hwang-Soo Joo e Otto, 2012).



Pigmentos

Os pigmentos produzidos por *Pseudomonas aeruginosa*, funcionam como fatores de virulência, sua secreção retarda o crescimento de outras espécies de bactérias e contribuem para a expressão de outros determinantes de virulência como na formação do biofilme (Pierson e Pierson, 2010; Jimenez et al, 2012; Das et al, 2013).

Os pigmentos mais importantes são pioverdina que é mais expressivo como um sideróforo no mecanismo de regulação da absorção do ferro e a piocianina implicada no processo de transporte de elétrons (Jimenez et al, 2012; Peek et al, 2012; Balasubramanian et al, 2013; Das et al, 2013).

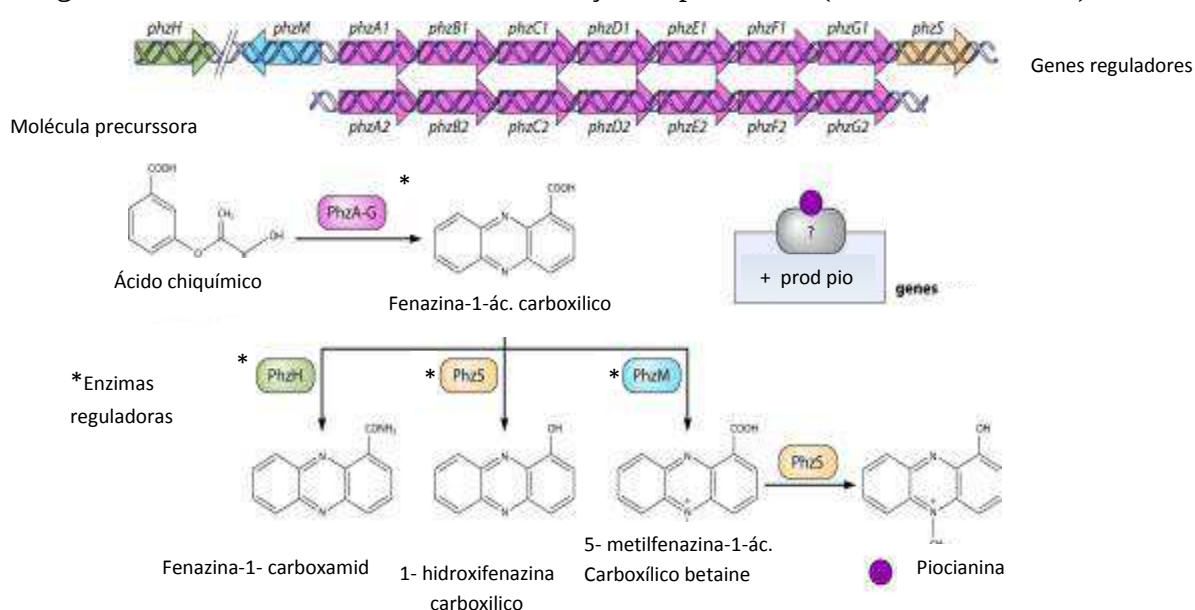
Piocianina pertence a família das fenazinas, compreendendo um grande grupo de compostos heterocíclicos que apresentam um grupamento nitrogênio derivadas da via do ácido chiquímico. As fenazinas diferem entre si por suas propriedades físico-químicas com base no tipo e posição dos grupos funcionais e sua principal característica é o potencial de oxi-redução (Pierson e Pierson, 2010).

Diversas espécies de bactérias produzem fenazinas, cinco genes ditos essenciais e altamente conservados são responsáveis pela síntese da sua estrutura básica (Pierson e Pierson, 2010). Em *P. aeruginosa* dois operons homólogos estão envolvidos na síntese de fenazinas: *phzA2B2C2D2G2* que codifica *phzA2* e *phzA1B1C1D1G1* que codifica

phzA1, sendo este último o responsável pela maior parte da biossíntese (Liang et al, 2011).

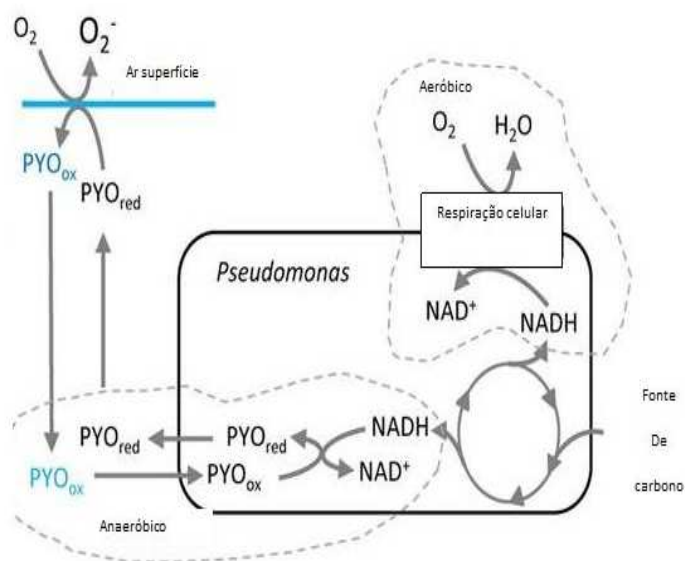
A regulação da piocianina em *P. aeruginosa* é realizada em conjunto pelos genes *phzM*, *phzH* e *phzS*, responsáveis pela codificação das principais proteínas reguladoras do processo de produção deste fator de virulência. A síntese final é o resultado da ação sequenciada das proteínas *PhzH*, *PhzS* e *PhzM*, no entanto *PhzS* sozinha pode facilitar a conversão final da piocianina (Pierson e Pierson, 2010; Liang et al, 2011; Rada e Leto, 2013).

Figura 9: Biossíntese do sistema de sinalização de piocianina (Jimenez et al, 2012).



A piocianina atravessa as membranas biológicas facilmente, servindo como um transportador de elétrons, seu principal receptor é o oxigênio, gerando o ânion superóxido e adquirindo a cor azul (oxidado). Este composto aceita principalmente elétrons do NADH gerados na oxidação de fontes de carboidratos, ajudando assim *P. aeruginosa* a sobreviver em condições de microaerofilia ou anaerobiose. Ao atravessar as membranas das células hospedeiras, facilmente oxida NADP e NADPH e em uma reação em cadeia diminui também a glutatona e o ATP, induzindo assim a formação de espécies reativas de oxigênio (EROs) que são importantes para várias funções celulares, mas em excesso perturbam o bom funcionamento celular, expondo as células a um estresse oxidativo intenso que excede a capacidade antioxidante. O aumento de EROs gera um feedback positivo para a secreção de piocianina, ou seja, quanto mais EROs são formados mais piocianina é produzida (Pierson e Pierson, 2010; Rada e Leto, 2013).

Figura 10: Oxidação de NADP e NADPH pela piocianina (Rada e Leto, 2013).



A presença da piocianina induz também a alterações na expressão de genes que modulam a resposta inflamatória e em associação com os EROs estimula o fator de transcrição nuclear Kappa B (NF- κ B) aumentando a síntese de várias moléculas pró-inflamatórias, entre elas interleucina-8 (IL-8) e a molécula adesão intercelular (ICAM1) atraindo neutrófilos, cuja atividade descontrolada provoca danos teciduais severos. Além desses Fator de necrose tumoral α (TNF- α), IL-1, IL-2, IL-6, IL-11, IL-19, IL-20, IL-23, leucotrieno bem como G-CSF, GM-CSF são também induzidos e liberados pelo epitélio respiratório. A lesão tecidual é agravada pela inibição do fator α 1PI que modula a atividade da serina-protease, e da enzima catalase que degradam o peróxido de hidrogênio (Pierson e Pierson, 2010; Rada e Leto, 2013).

A patogênese da piocianina ainda inclui a inibição da frequência do batimento ciliar nas células epiteliais das vias aéreas, crescimento das células epidérmicas pela estimulação do fator de crescimento celular (EGFR) induzida pelas proteínas pró-inflamatórias IL-1, IL-6 e TNF- α (Pierson e Pierson, 2010; Rada e Leto, 2013).

A piocianina também funciona como um sistema de sinalização controlando um conjunto de genes envolvidos na expressão das bombas de efluxo e genes de aquisição de ferro (Jimenez et al, 2012).

Além de aumentar a expressão de genes reguladores de mucina: MUC5B, MUC20, MUC13, MUC2 e MUC5AC, a mucina é uma glicoproteína secretada pela

mucosa das vias aéreas, responsável pela formação de uma camada mucóide na parte superior do epitélio com a função de aprisionar bactérias inaladas e detritos. Em condições patológicas a superprodução de mucina obstrui as vias aéreas e promove a aderência bacteriana aumentando o estresse oxidativo celular (Rada e Leto, 2013).

2.2 Mecanismos de resistência aos antibióticos

Pseudomonas aeruginosa apresenta naturalmente resistência a vários antimicrobianos. A baixa permeabilidade membranar, expressão de genes que regulam a secreção de enzimas e sistemas de resistência fazem com que as opções medicamentosas sejam mais escassas do que para outros microorganismos patogênicos, o que configura um grave problema em saúde (Strateva e Yordanov, 2009; Davies e Davies, 2010).

Plasmídeos

São as estruturas responsáveis pela transferência da informação genética de um fenótipo de resistência, e por esta razão também denominados de plasmídeos R, desempenham um papel importante na adaptação bacteriana a novos ambientes, proporcionando o acesso a um pool de genes acessórios que permitem a bactéria sobreviver em ambientes hostis. São classificados em grandes e pequenos plasmídeos de acordo com seu tamanho e biologia (Nikaido, 2009; Millan et al, 2014).

Integrans são elementos que pela sua estrutura apresentam mecanismos de aquisição de genes de resistência além das enzimas integrases expressam em sua extremidade proximal o local de reconhecimento enzimático no qual os cassetes gênicos podem ser inseridos, e também uma região promotora responsável pela transcrição dos genes (Davies e Davies, 2010).

Produção de enzimas inativadoras

β -lactamase

As β -lactamases são enzimas presentes no espaço periplasmático, que apresentam a capacidade de romper a ligação amida do anel β -lactâmico presente nos antibióticos gerando subprodutos inativos. A classificação molecular é realizada de acordo com as sequências de nucleótidos e aminoácidos presentes. Quatro classes de β -

lactamases são conhecidas: A-D, e subdivididas de acordo com seu mecanismo funcional, a classe B ou metalo- β lactamase (MBL) apresenta o zinco no seu sítio ativo e as demais serina (Strateva e Yordanov, 2009).

Pseudomonas aeruginosa pode produzir várias classes de β -lactamases que conferem resistência a diversos β -lactâmicos (Nikaido, 2009; Barbier e Wolff, 2010; Machado et al, 2011; Neves et al, 2011).

AmpC β -lactamase é também conhecida por cefalosporinase, normalmente é expressa em baixas concentrações porém pode ocorrer indução da sua superexpressão, determina a resistência a aminopenicilinas e as primeiras cefalosporinas (Strateva e Yordanov, 2009).

Oxacillinas (OXA) pertencem a classe D molecular e grupo funcional 2d e são subclassificadas em cinco grupos de acordo com seu espectro de atividade. Em sua maioria são codificadas por plasmídeos ou genes localizados em integrons, o que contribui para sua disseminação fácil e aumento de prevalência. A depender do tipo de OXA expressa é codificada resistência a diferentes antibióticos: carboxipenicilinas e ureidopenicilinas, ticarcilina, piperacilina, cefotaxima, cefepima, ceftazidima, aztreonam, moxalactama e ceftazidime (Strateva e Yordanov, 2009).

As MBLs são também conhecidas como carbapenases, sua produção determina resistência a todos os β -lactâmicos (exceção aztreonam). Tem sua produção regulada por um integron classe 1, que também transporta genes para as enzimas modificadoras de aminoglicosídeos e ceftazidime (Strateva e Yordanov, 2009).

Metilases

Essas enzimas estão relacionadas com a resistência aos aminoglicosídeos, modificam a estrutura do antibiótico antes que este se ligue ao seu sítio alvo, diminuindo a afinidade de ligação destes antibióticos modificados com o alvo na célula bacteriana, a subunidade ribossomal 30S. As metilases são codificadas por plasmídeos e interferem tanto nos grupamentos amins como nas hidroxilas, por meio de fosforilação (fosforiltransferase) e adenilação (nucleotidiltransferase e adeniltransferase) dependentes de ATP e acetilação (acetiltransferase) dependentes de Acetil-CoA (Nikaido, 2009; Neves et al, 2011).

Acúmulo de diferentes mutações bem como uma captação reduzida do antimicrobiano, devido à permeabilidade diminuída da membrana externa também induzem a resistência aos aminoglicosídeos (Strateva e Yordanov, 2009).

Expressão de Bombas de Efluxo

Formadas por sistema triplo de proteínas de transporte, localizado na membrana citoplasmática, periplasma e membrana externa, reconhece as propriedades físico-químicas das substâncias dispersas no interior da célula bacteriana (Nikaido, 2009; Barbier e Wolff, 2010; Xavier et al, 2010). Por meio de um mecanismo de transporte ativo a bactéria expulsa para o exterior da célula tudo o que é indesejado, inclusive os antimicrobianos através da abertura dos canais de porina (Neves et al, 2011).

A regulação deste mecanismo é realizada por um sistema de efluxo da família RND (resistance-nodulation-cell division), que apresenta várias proteínas: MexAB-OprM, MexCD-Oprj, MexEF-OprN, MexXY-OprM (Xavier et al, 2010; Neves et al, 2011). O primeiro componente é uma proteína localizada na membrana citoplasmática funcionando como uma bomba dependente de energia com grande especificidade pelo substrato, o segundo componente é uma proteína da membrana externa e atua como uma porina, e o terceiro uma proteína localizada no espaço periplasmático unindo as outras duas e estabilizando o complexo (Verchère et al, 2014).

MexAB-OprM e MexXY-OprM tem participação nos mecanismos de resistência naturais e adquiridas, enquanto os demais somente participam na resistência adquirida. A presença da bomba de efluxo não é suficiente para desencadear um processo de resistência, mutações nos seus elementos de regulação, fazem com sejam superexpressas e assim capazes de conferir resistência a vários antimicrobianos (Barbier e Wolff, 2010).

A superexpressão de MexAB-OprM normalmente ocorre por mutações no gene que codifica a proteína repressora MexR e confere resistência a maioria dos β -lactâmicos. MexCD-Oprj pode não ser expressa de forma constitutiva, porém mutações no gene *nfxB* que codifica um repressor de transcrição, leva a sua superexpressão que está relacionada com a resistência a cefepima, quinolonas, macrólidos, tetraciclina e cloranfenicol (Vaez et al, 2014).

O sistema MexEF-OprN é superexpresso como resultado de uma mutação no locus *mexT* do gene *nfxC*, e confere resistência a quinolonas, cloranfenicol e trimetoprim, e a resistência cruzada para carbapenêmicos (Vaez et al, 2014).

Mutações no gene repressor *mexZ* induzem a superexpressão de MexXY-OprM de forma constitutiva, e este sistema promove resistência a aminoglicosídeos, tetraciclina e eritromicina (Barbier e Wolff, 2010).

Cada sistema de efluxo tem nas diferentes classes de antimicrobianos os seus substratos preferenciais, porém as fluoquinolonas são comuns a todos eles (Strateva e Yordanov, 2009).

Quadro 1: Sistemas de efluxo e seus substratos (Strateva e Yordanov, 2009)

Bomba de membrana citoplasmática	Vinculador periplasmático	Canal na membrana externa	Substrato
MexB	MexA	OprM	Quinolonas, macrolídeos, tetraciclinas, lincomicina, cloranfenicol, novobiocina, β -lactâmicos (exceto imipenem).
MexD	MexC	OprJ	Quinolonas, macrolídeos, tetraciclinas, lincomicina, cloranfenicol, novobiocina, sulbenicilina, cefepima, cefpirome, meropenem, penicilinas (exceto carbenicilina)
MexF	MexE	OprN	Fluoroquinolonas e carbapênicos.
MexY	MEXX	OprM	Quinolonas, macrolídeos, tetraciclinas, cefepima, lincomicina, cloranfenicol, aminoglicosídeos, sulbenicilina, cefpirome, meropenem, penicilinas, (exceto carbenicilina)

Porinas

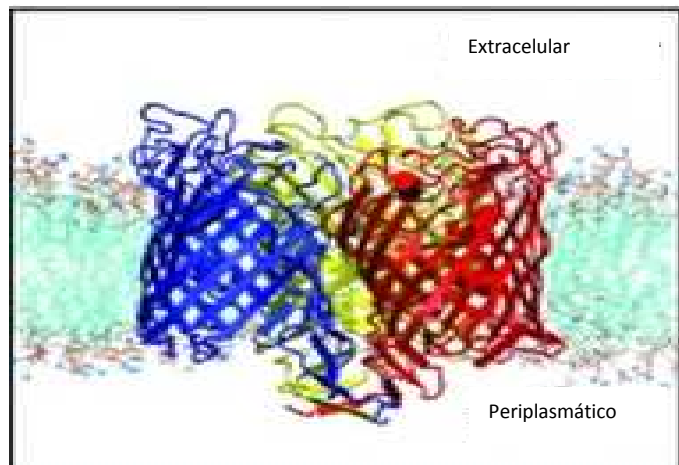
São estruturas presentes na membrana da célula bacteriana, formam canais seletivos facilitadores da difusão de pequenas moléculas estruturalmente afins, entre elas os antimicrobianos, para o espaço periplasmático (Fito-Boncompagni, 2011). Esses canais medeiam a captação por difusão passiva ao longo de um gradiente de concentração presente em toda a membrana externa, além de participarem da patogenicidade de *P. aeruginosa* por sua associação com a expressão de diversos fatores de virulência (Arhin e Boucher, 2010; Eren et al, 2012).

Diferentes porinas são expressas, e cada uma delas apresenta afinidade a substratos específicos (Eren et al, 2012).

A superfamília OprD é composta por 19 membros, e tem um papel específico na absorção de aminoácidos carregados positivamente, tais como a lisina, glutamato, peptídeos, transporte de fontes de carbono e tem relação com a permeabilidade para carbapenêmicos e β -lactâmicos (Alain et al, 2012; Eren et al, 2012). OprD apresenta maior relação com a penetração de antimicrobianos na célula bacteriana, alterações genéticas que reduzem a expressão desta porina contribuem para o aumento da resistência aos antimicrobianos (Arhin e Boucher , 2010).

OprF é a mais abundante proteína de membrana externa de *P. aeruginosa*, forma um canal hidrófilo que permite a difusão inespecífica de íons, açúcares de baixo peso molecular e antimicrobianos, além de estar envolvida na expressão de fatores de virulência (Bouffartigues et al, 2012). OprP tem como substrato o fósforo, sendo sua expressão induzida quando os níveis desse íon chegam a valores muito baixos. (Pongprayoon et al, 2009).

Figura 11: Estrutura da OprP (Pongprayoon et al, 2009)



2.3 Mecanismos de ação dos antimicrobianos

Os antimicrobianos podem ser produzidos por microorganismos ou de forma sintética, são classificados de acordo com sua estrutura química e mecanismo de ação, e apresentam a capacidade de interferir no crescimento ou sobrevivência de outras espécies, os diferentes mecanismos de ação possibilitam uma atividade mais dirigida contra Gram-negativas ou Gram-positivas (Guimarães et al, 2010).

Alteração da síntese do Ácido Nucléico (Quinolonas)

O alvo dessa classe de antibióticos são as enzimas necessárias para a continuidade do processo de replicação do ácido nucleico (DNA), a DNA girase ou topoisomerase II e a topoisomerase IV. Em um processo normal essas enzimas entrariam em ação após a clivagem do DNA para replicação e a transcrição deste.

A topoisomerase IV parece ser o alvo principal de quinolonas em bactérias Gram-positivas, enquanto que a topoisomerase II é o alvo primário nas Gram-negativas. As quinolonas, ligam-se a essas enzimas, formando um complexo quinolona/enzima/DNA, bloqueando a replicação do DNA nos pontos onde está presente (Kohanski (Kohanski et al, 2010).

Inibição da síntese da parede celular (β -lactâmicos, carbapenêmicos e glicopídeos)

O peptidoglicano é um polímero de parede celular bacteriana, sua presença permite a bactéria suportar as pressões osmóticas, é constituído por aminoácidos, ácido murâmico e acetilglicosamina, mas é sobre ação das enzimas transpeptidase e transglicosilase que acontece a sua montagem final e manutenção. Ainda no processo de formação do peptidoglicano, temos a ação das chamadas autolisinas, que são enzimas associadas a membranas responsáveis por regular o crescimento do peptidoglicano mantendo a parede celular estável (Farha et al, 2013).

O alvo dessa classe de antimicrobianos são as enzimas transpeptidases, também conhecidas como proteínas ligadoras de penicilina, o seu bloqueio se dá através da ligação com o anel de amida cíclico presente nos antimicrobianos que é análogo ao aminoácido constituinte do peptidoglicano (D-alanil-D-alanina) e funciona como um substrato enzimático. Sem enzima ativa o processo de formação do peptidoglicano é impedido (Kohanski et al, 2010).

O processo de morte celular mediada por esses antimicrobianos é decorrente tanto da ausência de formação do peptidoglicano, como pela continuidade da atividade das autolisinas, levando a uma intensa desregulação que impede a viabilidade bacteriana (Kohanski et al, 2010).

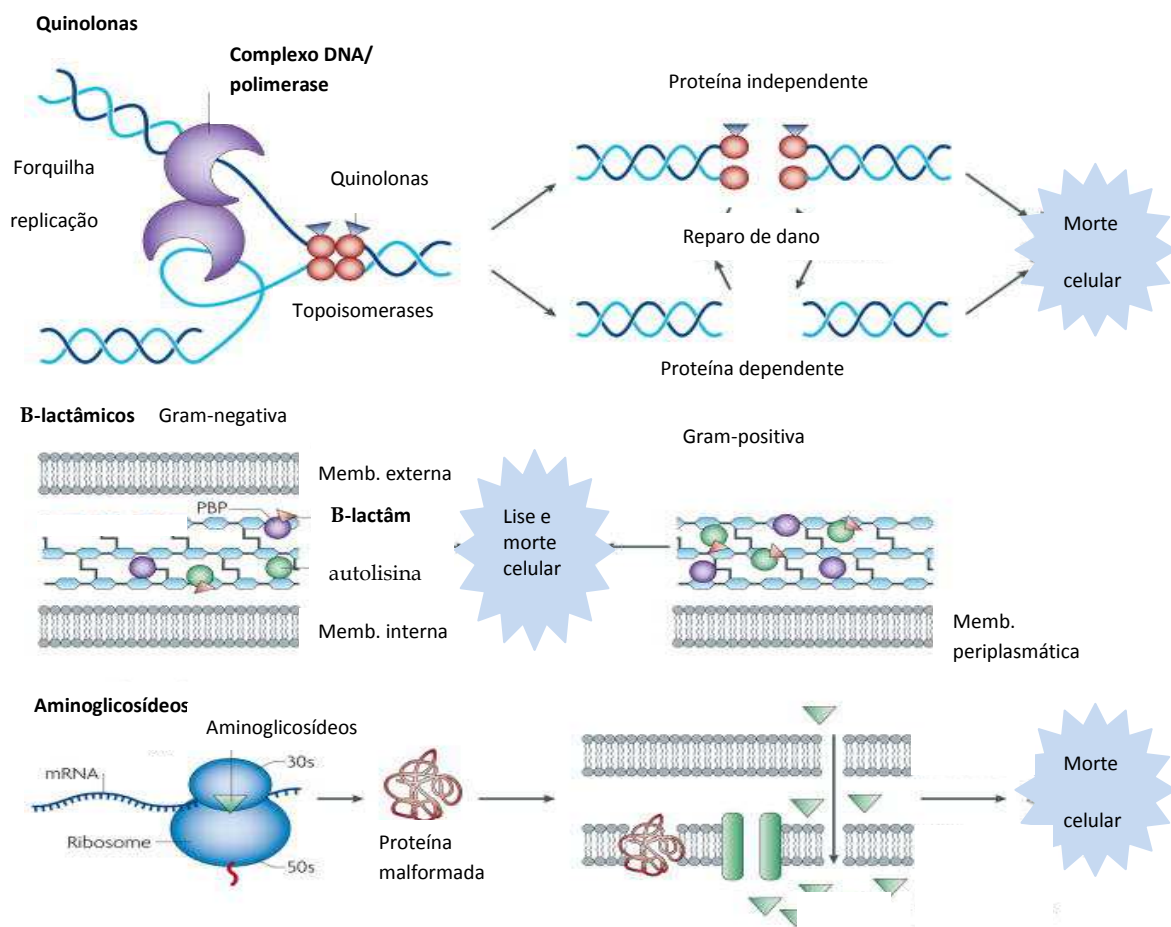
Inibição da síntese protéica (Macrolídeos, Aminoglicosídeos, Tetraciclina)

O efeito bactericida é devido a ligação desses antimicrobianos com proteínas essenciais para a sobrevivência do microrganismo, atuam impedindo que a tradução do RNAm aconteça de forma correta, processo esse que engloba as fases de iniciação,

alongamento e terminação e envolve unidades de ribossomos e moléculas iniciadoras. O ribossomo é constituído por duas subunidades de ribonucleoproteínas a 50S e a 30S, a inibição de uma delas acarreta em uma não tradução ou em uma tradução errônea do código RNA (Marceau et al, 2013).

O bloqueio varia de acordo com o mecanismo de ação do fármaco: a nível da unidade 50S ou bloqueiam fisicamente a iniciação da tradução proteica caso das oxazolidinonas ou a translocação do peptidil-RNAt como os macrolídeos, inibindo assim a reação de peptidiltransferase que alonga a cadeia peptídica nascente. A nível da subunidade 30S exercem sua atividade bloqueando o acesso dos aminoacil-RNAts ao ribossomo como as tetraciclínas ou interferindo na estabilidade da ligação peptidil-RNAt/ribossomo que pode ou não induzir uma alteração na conformação do codón de RNA transcrito e levar a formação de uma proteína anormal, mecanismo dos aminoglicosídeos (Kohanski et al, 2010).

Figura 12: Esquema do mecanismo de ação de quinolonas, β -lactâmicos e aminoglicosídeos (Kohanski et al, 2010).



Ação sobre a estrutura e função da membrana celular (Polimixinas)

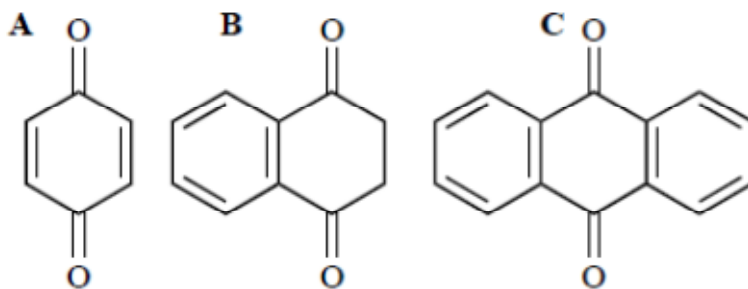
A parede externa das bactérias Gram-negativas é formada por diversas unidades de polissacarídeos que juntos constituem o lipopolissacarídeo, dentre esses polissacarídeos o lipídio A é o principal facilitador do mecanismo de ação dessa classe de antimicrobianos (Velkov et al, 2013).

Poli-peptídeos catiônicos através de interações eletrostáticas se ligam aos lipopolissacarídeos de membrana, especialmente ao lipídio A. Destruindo a integridade da membrana por alterar os sistemas de transporte ativo e permeabilidade seletiva através da formação de poros por onde as bactérias perdem os seus componentes estruturais (Cho et al, 2012).

2.4 β - lapachona

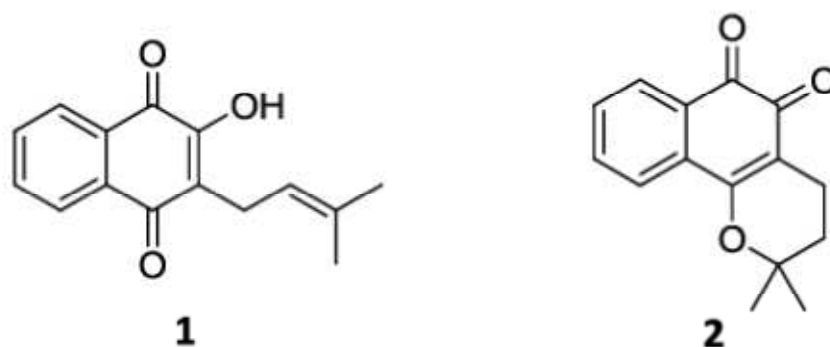
A β -lapachona (3,4-diidro-2,2-dimetil-2H-naftol [1,2- β]pirano-5,6-dione) é uma quinona, um grupo de compostos químicos altamente reativos, que representa uma das mais variadas classes de produtos naturais e participa de fases importantes dos ciclos de vida dos seres vivos (Kumagai et al, 2012). São derivadas a partir de compostos aromáticos pela permuta de grupos $-\text{CH}=\text{}$ por grupos de $-\text{C}(=\text{O})-$ (Kobayashi et al, 2011), formando diferentes quinonas que são classificadas de acordo com o tipo de anel aromático e a disposição de suas carbonilas: benzoquinonas (anel benzênico); naftoquinonas (anel naftaleno); antraquinonas (anel antracênico), estes isômeros diferem tanto suas propriedades físico-químicas quanto na sua atuação biológica (Ferreira e Souza, 2003).

Figura 13: **A** 1,4-benzoquinona; **B** 1,4-naftoquinona; **C** 9,10-antraquinona (Kobayashi et al, 2011)



O precursor da β -lapachona é o lapachol (figura 15) que inicialmente foi isolado como constituinte do cerne das árvores da família Bignoniaceae, especialmente o gênero *Tabebuia*, popularmente conhecido como ipê, mas que também pode ser encontrado em outras famílias como Sapotaceae, Verbenaceae, Leguminosae, Scrophulariaceae, Malvaceae e Proteaceae (Pinto e Castro, 2009; Silva et al, 2009; Ferreira et al, 2010).

Figura 14: Estrutura química do lapachol (1) e da β -lapachona (2) (Ferreira et al, 2010)



Apresenta uma variedade de propriedades farmacológicas: antitumoral, antiinflamatória, antiparasitária, antiviral e antimicrobiana. Apesar de ainda não ser um fármaco, tem importância do ponto de vista científico. Talvez por essa razão a utilização comercial esteja próxima. O que pode ser demonstrado pelas diversas patentes depositadas e concedidas no últimos anos e também pela existência de alguns ensaios clínicos em fase III para o tratamento do Câncer (Ferreira e Souza, 2003; Ferreira et al, 2010; Cheng et al, 2012).

A atividade antitumoral da β -lapachona está relacionada a inibição das topoisomerasas I e II que são enzimas que mantêm a integridade do DNA. Estas enzimas reparam possíveis erros e qualquer alteração no funcionamento dessas enzimas induz a apoptose celular. A β -lapachona tem atividade sobre diversos tipos de câncer tais como pulmão, mama, cólon, próstata e melanoma, em retinoblastoma e no mieloma múltiplo além de inibir a proliferação celular e induz a apoptose das células mutadas por ativação de enzimas e mecanismos indutores de morte celular (Ferreira e Souza, 2003; Almeida, 2009).

A inibição tumoral provocada pela β -lapachona também pode ter relação como uma possível inibição da angiogênese, o que é fundamental no desenvolvimento tumoral (Hussain et al, 2007).

A importância da β -lapachona como molécula antitumoral vai além da sua atividade isolada, estudos demonstraram um efeito benéfico de sua associação com outras drogas anticancerígenas, bem como uma potencialização dos efeitos apoptóticos das radiações ionizantes diminuindo o tempo e as doses de radiação (Ferreira et al, 2010).

O potencial antiinflamatório da β -lapachona está na inibição da expressão do óxido nítrico (NO), prostaglandinas, além de atenuar a expressão de proteínas e citocinas pró-inflamatórias como a interleucina (IL1, IL-6) e o fator de necrose tumoral (TNF) (Hussain et al, 2007).

Sua atividade antiviral tem relação com inibição das enzimas transcriptase reversa e α -polimerase do DNA (Ferreira e Souza, 2003; Almeida, 2009).

Os efeitos antiparasitários, antifúngicos e antibacterianos induzidos pela β -lapachona são decorrentes de sua capacidade de induzir às células a um estresse oxidativo, com consequente formação de espécies reativas de oxigênio. O desequilíbrio entre a formação e a eliminação das espécies reativas de oxigênio leva a célula a morte (Ferreira e Souza, 2003; Almeida, 2009; Ferreira et al, 2010).

A β -lapachona por ação enzimática reduz o oxigênio a superóxido que na presença da enzima superóxido dismutase gera peróxido de hidrogênio, este reage com metais de transição pela reação de Fenton ou com o ânion superóxido pela reação de Harber-Weiss gerando oxidrilas reativas que oxidam e danificam biomoléculas (Ferreira e Souza, 2003; Pinto e Castro, 2009; Ferreira et al, 2010; Kumagai et al, 2012).

As consequências dos danos são variadas: desintegração de membrana citoplasmática, desestabilização da força motriz de prótons, alteração no fluxo do transporte ativo de elétrons, e coagulação do conteúdo intracelular, desestabilização de DNA (Silva e Fernandes, 2010).

2.5 Associações farmacológicas

A combinação de substâncias com potencial farmacológico, sejam elas sintéticas ou oriundas de metabólitos naturais, pode resultar em diferentes interações, classificadas em: antagônicas, aditivas ou sinérgicas (Feala, 2010).

Em interações antagônicas a resposta farmacológica de um medicamento é suprimida ou reduzida na presença do outro (Guimera e Sales- Pardo, 2013). Nas

interações aditivas a combinação é correspondente com as potências individuais das substâncias (Feala, 2010). E no efeito sinérgico observa-se um aumento da atividade na associação, ou seja, uma potencialização de efeito na associação que supera o desempenho individual, que não só aumenta a eficácia dos tratamentos, mas também podem melhorar a selectividade e diminuir os efeitos indesejados (Feala, 2010; Olufunmiso et al, 2012; Guimera e Sales- Pardo, 2013).

Graficamente essas associações são demonstradas na forma de isobologramas, onde nos eixos das ordenadas e abcissas são considerados as concentrações inibidoras das substâncias para um determinado efeito, se após a construção do gráfico uma linha convexa for observada, tem-se o um efeito antagônico, efeitos aditivos são visualizados por uma linha reta no gráfico e o sinergismo é evidenciado por uma linha côncava ligando os pontos correspondentes as interações das duas substâncias (Biavatti, 2009)

A atual situação da resistência bacteriana, faz surgir a necessidade de soluções para o difícil tratamento das bactérias multirresistentes (Guimarães, 2010). A utilização de derivados de produtos naturais em associação com antimicrobianos convencionais vem sendo estudada como uma alternativa para o combate desses microorganismos patogênicos (Palmeira et al, 2010; Chanda e Rakholiya, 2011).

A utilização de fitocompostos com potencial antimicrobiano tem a vantagem de que essas substâncias são de fácil obtenção e têm boa biodisponibilidade na natureza, seu uso combinado com antimicrobianos pode representar num futuro próximo uma nova abordagem na terapia antimicrobiana (Chanda e Rakholiya, 2011; Fernandes et al, 2012).

Antimicrobianos de origem vegetal são considerados potenciadores sinérgicos, pois embora isoladamente possam não apresentar propriedades antimicrobianas significativas, quando utilizados em associação com outros antimicrobianos, aumentam o efeito destes (Chanda e Rakholiya, 2011). A importância terapêutica das associações sinérgicas é conhecida desde as mais antigas civilizações e utilizadas pela comunidade médica (Radulovi et al, 2013).

Associações sinérgicas com produtos de origem natural vem sendo publicadas recentemente, Fernandes e colaboradores (2012) e Macedo e colaboradores (2013) respectivamente demonstraram a atividade sinérgica do *Psidium guineense* e da β -

lapachona em associação com antimicrobianos convencionais frente o *Staphylococcus aureus* metilicina resistentes.

A redução na formação do biofilme e na expressão de fatores de virulência de *Pseudomonas aeruginosa* pelo uso combinado de uma lactona diterpenóide e vários antimicrobianos foi demonstrada por Xiangping Zeng e colaboradores (2011).

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar a associação entre antimicrobianos convencionais e β -lapachona frente a cepas de *Pseudomonas aeruginosa* multirresistentes.

3.2 Objetivos específicos

Determinar a concentração inibitória mínima (CIM) e a concentração bactericida mínima (CBM) do meropenem, ceftazidima pentahidratada, cloridrato de cefepime, ciprofloxacino, piperacilina sódica-tazobactam, sulfato de polimixina B e da β -lapachona frente a dez cepas de *Pseudomonas aeruginosa*;

Avaliar o tipo de interação através da determinação do índice da concentração inibitória fracionada (FICI) da β -lapachona e dois agentes antimicrobianos frente as cepas mais resistentes de *Pseudomonas aeruginosa*;

Testar a formação de biofilme por cepas de *Pseudomonas aeruginosa* expostas as associações mais eficazes β -lapachona/antimicrobiano, definidas pelo melhor índice da concentração inibitória fracionada (FICI).

Verificar a produção de piocianina por cepas de *Pseudomonas aeruginosa* expostas as associações mais eficazes β -lapachona/antimicrobiano definidas pelo melhor índice de concentração inibitória fracionada (FICI).

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Microrganismo

As cepas de *Pseudomonas aeruginosa* (n=10) utilizadas neste trabalho pertencem ao Laboratório de Fisiologia e Bioquímica de Microrganismos do Departamento de Antibióticos da UFPE. Oito cepas foram isoladas de espécimes clínicos (LFBM 01, LFBM 02, LFBM 05, LFBM 06, LFBM 16, LFBM 16, LFBM 17, LFBM 18), uma isolada de água potável (LFBM 19) e uma cepa da American Type culture collection *P. aeruginosa* ATCC 9027.

Quadro 2: Cepas de *Pseudomonas aeruginosa*: origem e perfil de resistência aos antimicrobianos.

<i>P. aeruginosa</i>	Origem	Resistência
LFBM 01	Sangue	GAT;GEN;CFO;CTX
LFBM 02	Secreção	GEN;AMI;CFL;CFO
LFBM 05	Sangue	CLO;ATM;SZT;AMP+SUB
LFBM 06	Secreção	GEN;CFL;CFO;CTX
LFBM 15	Secreção	AMI;GAT;LEV;IMP
LFBM 16	Sangue	CFO;CTX;CLO;IMP
LFBM 17	Secreção	SZT;ATM;TOB;IMP
LFBM 18	Sangue	STZ;IMP;LEV;TOB
LFBM 19	ÁGUA	AMI;IMP;GEN;LEV
ATCC 9027	ATCC	CEPA DE REFERÊNCIA

GAT=Gatifloxacina ;GEN= Gentamicina; AMI= Amicacina ;CFL= Cefazolina; CFO= Cefoxitina; CTX= Cefotaxime; CLO= Clorafenicol; IMP= Imipenem; SZT= Sulfisoxazole;ATM= Aztreonam; AMP+SUB= Ampicillina-Sulbactam; TOB= tobramicina; LEV=Levofloxacina.

4.1.2 Cultura, manutenção e padronização do inóculo

As cepas foram mantidas e estocadas em Agar Mueller-Hinton sob óleo mineral. Para a reativação as culturas foram transferidas para tubos contendo caldo Mueller-Hinton e incubadas a 37° C por 24 horas. Após a reativação as culturas foram padronizadas através de diluições e comparações da suspensão com o tubo 0,5 da escala de Mac Farland que corresponde a 10⁸ UFC/mL. Em seguida este inóculo foi semeado em placas de Petri contendo o Ágar cetrimida, meio seletivo para *Pseudomonas aeruginosa*.

A partir da cultura crescida em Ágar cetrimida, três colônias foram inoculadas em caldo Mueller-Hinton a 37°C por 18 horas. Em seguida, uma alíquota de 0,1mL foi transferida para outro tubo contendo caldo Mueller-Hinton e incubada por 3 horas a 37°C. Desta suspensão foi realizada uma diluição de 1:100 ao décimo de forma a obter uma suspensão de concentração de 10⁶ UFC/mL.

4.2 Agentes antimicrobianos

Meropenem (Laboratório ABL LTDA), ceftazidima pentahidratada (Laboratório Nova Farma LTDA), cloridrato de cefepima (Laboratório Biochemico LTDA), ciprofloxacino (Laboratório Eurofarma), Piperacilina sódica-tazobactam (Laboratório Cellofarma LTDA) e sulfato de polimixina B (Laboratório Quimica Haller) foram os antimicrobianos utilizados neste estudo. Estes foram pesados em balança analítica de precisão de modo a obter uma solução de concentração igual à 4096 µg/mL e solubilizadas em água pura.

Os critérios de resistência de *Pseudomonas aeruginosa* foram definidos com base no Clinical Laboratory Standard Institute (CLSI) 2013: meropenem (CIM ≥ 8µg/mL), ceftazidima (CIM ≥ 32µg/mL), cefepima (CIM ≥ 32µg/mL), ciprofloxacino (CIM ≥ 4µg/mL), piperacilina-tazobactam (CIM ≥ 128/4µg/mL) e polimixina B (CIM ≥ 8µg/mL) (CLSI, 2013).

4.3 β -lapachona

A β -lapachona foi obtida no Departamento de Antibióticos da UFPE, com grau de pureza de 99,9%, na forma de cristais alaranjados, que foram solubilizados em um sistema composto por Etanol/tween 80/água destilada na proporção de 1,5/0,5/3,5 v/v.

Todas as soluções foram esterilizadas por filtração utilizando membrana Millipore® com 0,22 μ m de porosidade.

4.4.1 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

Para determinação da CIM foi utilizado o método de microdiluição em placa de 96 poços como preconizado pelo CLSI, 2013.

Inicialmente 100 μ L de caldo Mueller Hinton foram dispensados em todos os poços da microplaca, logo em seguida 100 μ L da solução dos antimicrobianos a serem avaliados foram colocados nos poços da primeira linha e em seguida realizadas diluições sucessivas até a última linha. As concentrações variaram de 4096 a 0,250 μ g/mL. Em seguida um volume de 5 μ L (contendo 10^4 UFC/poço de concentração final) das culturas de *P. aeruginosa* foi distribuído em todos os poços e essa microplaca incubada a 37°C por 18 horas. Após este período de incubação, foi adicionado 20 μ L de uma solução aquosa de resazurina (solução reveladora) a 0,02% e a placa foi novamente incubada a 37°C por 2 horas. Uma coloração rosa indicou crescimento bacteriano e uma coloração azul indicou a inibição do crescimento bacteriano. A atividade antimicrobiana do solvente foi também avaliada para assegurar a ausência de uma possível atividade intrínseca sobre os microorganismos.

A Concentração Inibitória Mínima foi definida como a menor concentração capaz de impedir o crescimento bacteriano indicada pela coloração azul.

4.4.2 Determinação da Concentração Bactericida Mínima (CMB)

A partir da CIM previamente definida foram semeados 10 μ L dos poços onde não houve crescimento visível. Este semeio foi realizado em placas de Petri contendo o meio Mueller Hinton sólido e as placas incubadas a 37° C por 18 horas. Após este período, foi avaliado o número de colônias por placa e determinada a concentração bactericida mínima. A CBM foi definida como a menor concentração do antimicrobiano capaz de inviabilizar 99,9% da população bacteriana inicial (CLSI, 2013).

4.4.3 Determinação da Concentração Inibitória Fracionada (*checkerboard*)

Através dos valores obtidos da CIM, foram preparadas soluções dos agentes antimicrobianos e da β -lapachona, todos em caldo Mueller Hinton e de forma a obter concentrações sub-inibitórias que variaram de 0,5 x CIM a 0,0002 x CIM para agentes antimicrobianos e de 0,5 x CIM a 0,0039 x CIM para a β -lapachona. De cada uma das diluições dos agentes antimicrobianos, foram depositados 100 μ L nos poços da placa de microdiluição na orientação vertical e na orientação horizontal foram depositados o mesmo volume de cada uma das diluições da β -lapachona. Em seguida 5 μ L da suspensão bacteriana padronizada em 10^4 UFC de concentração final foram dispensados em cada poço, por fim a placa foi revelada com resazurina (figura 15) (Lorian et al, 2005).

O critério de interpretação da interação entre os antimicrobianos e a β -lapachona foi obtido após o cálculo do Índice da Concentração Inibitória Fracionada (FIC index) segundo a equação: (CIM do antimicrobiano associado a β -lapachona / CIM do antimicrobiano) + (CIM da β -lapachona associada ao antimicrobiano / CIM da β -lapachona). Valores de FICI $\leq 0,5$ foram interpretados como sinergismo total, Valores inseridos entre $0,5 < FICI \leq 0,75$ foram interpretados como sinergismo parcial. Efeito indiferente quando estes valores foram de $0,75 < FICI \leq 2$, e efeito antagônico > 2 (An et al, 2011).

Figura 15: Associação agente β -lapachona/antimicrobiano mostrando um sinergismo total (foto autoral).



4.5 Produção e inibição de biofilme

Para a produção do biofilme de *Pseudomonas aeruginosa* foi utilizado o meio Luria Bertani suplementado com 0,4% de glicose e 0,4% casaminoácidos (Cady et al,

2012). Um inóculo padronizado neste meio foi obtido da mesma forma como descrito no item 4.1.2. Este inóculo foi diluído a 1:100. Aliquotas de 100 µL foram retiradas e distribuídas em todos os poços das placas de microdiluição. Estas placas foram incubadas a 37° C por 24 horas. Após esse período as culturas foram descartadas e as células aderidas ao poliestireno das placas, lavadas duas vezes com água destilada esterilizada e coradas com 125 µL de uma solução de cristal violeta a 0,1%. Estas placas foram postas em repouso por 15 minutos em temperatura ambiente. Em seguida este corante foi descartado e os poços lavados quatro vezes com água destilada esterilizada. As placas foram postas em superfície plana até secar. Para revelação do biofilme formado foram adicionados 125 µL de ácido acético glacial a 30%, e durante 15 min as placas ficaram em repouso em temperatura ambiente. Este volume de 125 µL foi transferido para outra placa e a leitura realizada na leitora de microplacas Biotek® ELx800 em comprimento de onda 550nm, usando o ácido acético glacial a 30% como padrão negativo (O'toolle, 2011).

Para avaliação da inibição do biofilme, foram preparadas soluções dos antimicrobianos e da β-lapachona tendo por base os resultados do FICI de cada associação (menor FICI). Assim em cada poço foram distribuídos 50 µL do antimicrobiano, 50 µL da β-lapachona e 100 µL da suspensão bacteriana concentrada em 10⁴ UFC . As placas foram incubadas a 37° C por 24 horas. Após este período foi realizado o mesmo procedimento acima descrito para quantificação do biofilme formado. Exceto por um acréscimo em 100µL nas soluções de cristal violeta e ácido acético glacial.

4.6 Produção e inibição da piocianina

Para potencializar a produção de piocianina por *Pseudomonas aeruginosa* foi utilizado o meio BD Pseudomonas Agar P, cuja formulação consiste em bacto peptona 20,0 g /L; cloreto de magnésio 1,4 g /L; sulfato de potássio 10,0 g /L; glicerol 10,0 g /L; pH 7,0 ± 0,2. Bacto Peptona fornece o carbono e o nitrogênio necessários para o crescimento bacteriano, cloreto de magnésio potencializa a produção de piocianina e o sulfato de potássio e inibe a formação de fluoresceína.

As cepas foram inoculadas neste meio, cujo inóculo foi obtido da mesma forma como descrito no item 4.1.2. da cultura padronizada 0,5 mL foi dispensado em 9,5 mL do meio especial para produção de piocianina e incubado a 37° C por 72 horas. Em

seguida estas culturas foram centrifugadas por 20 minutos a 4.000 rpm, e um volume de 5 mL do sobrenadante transferido para outro tubo ao qual foi adicionado o mesmo volume de clorofórmio. Esta mistura foi homogenizada em vortex por 30 segundos e novamente centrifugada durante 15 minutos a 4.000 rpm. A fase aquosa foi desprezada e a fase orgânica foi acrescentado 1mL de ácido clorídrico a 0,2 N e homogenizada 30 segundos em vortex e em seguida centrifugada por 15 minutos a 4.000 rpm. Após precipitação das proteínas, o sobrenadante foi recolhido e neutralizado com NaOH a 0,04 M. A leitura foi realizada em espectrofotômetro Hewlett Packard 8453 em comprimento de onda de 690nm (Kurachi, 1958; Whooley e McLoughlin, 1982).

A inibição de piocianina seguiu o mesmo protocolo descrito acima. Exceto por: em um tubo contendo 9,0 mL de caldo foram depositados 0,25 mL de agente antimicrobiano + 0,25 mL de β -lapachona cujas concentrações foram definidas pelo melhor FICI e em seguida 0,5 mL da cultura padronizada (contendo 10^4 UFC/tubo) (Kurachi, 1958; Whooley e McLoughlin, 1982; Essar et al, 1990).

A curva de calibração para análise dos resultados obtidos, foi realizada com uma solução padrão de CuSO_4 , obtida da seguinte forma: foram dissolvidos em 50ml de água destilada: 0.4994g de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ e 0,6 g de tartarato de amônio, a fim de ajustar para um volume final de 100 ml , foi adicionada uma solução de NaOH 0,08 M (Kurachi, 1958).

5. Método de análise

A análise estatística foi realizada através do teste t-Student, usando o Graphpad Prism 5.0 para windows, Graphpad Software (San Diego, California) e $p < 0,05$ foi usado como nível significância.

6. ARTIGO

Efeito Sinérgico da β -lapachona em associação com antimicrobianos convencionais frente a *Pseudomonas aeruginosa* multirresistente e inibição de seus fatores de virulência: biofilme e piocianina.

K. Araújo, T. Silva, E.A. Ximenes

Laboratório de Fisiologia e Bioquímica de Microorganismos, Centro de Ciências Biológicas, Departamento de Antibióticos, Universidade Federal de Pernambuco, CEP-50670-901 Recife, Pernambuco, Brasil

RESUMO

Pseudomonas aeruginosa é um patógeno oportunista responsável por infecções nosocomiais graves e que cada vez ganha destaque pelo desenvolvimento de multiressistência. O objetivo deste trabalho foi avaliar o sinergismo da β -lapachona com antimicrobianos convencionais e sua atividade sobre fatores de virulência. Inicialmente foram testadas dez cepas de *Pseudomonas aeruginosa* com fenótipo de resistência previamente definido. Destas, quatro cepas (LFBM 01, LFBM 02, LFBM 16, LFBM 18) apresentaram um perfil de resistência a ciprofloxacino, meropenem e cloridrato de cefepima e por essa razão foram selecionadas para este estudo. Para verificar o efeito sinérgico entre a β -lapachona e os agentes antimicrobianos, foi utilizado-se o método de *checkerboard*. Os critérios utilizados para avaliar a atividade sinérgica foram definidos pelo Índice da Concentração Inibitória Fracionada (FIC índice). A partir dos melhores valores do FIC índice das associações β -lapachona/antimicrobiano foram avaliadas a atividade destas sobre a produção de biofilme e piocianina. Os valores do FIC índice variaram de 0,12 a 0,50 indicando uma interação sinérgica para a maior parte das associações. O percentual de redução na formação do biofilme foi acima de 70% para todas as associações, exceto para β -lapachona/meropenem frente cepa LFBM 18. O percentual de redução na produção de piocianina variou de 89,% a 98,9% e de 36 a 69,9% para a associação da β -lapachona com cloridrato de cefepima e meropenem respectivamente.

Palavras chaves: *Pseudomonas aeruginosa*. β -lapachona. Sinergismo. Biofilme. Piocianina.

ABSTRACT

Pseudomonas aeruginosa is an opportunistic pathogen responsible for serious nosocomial infections and that time is highlighted by the development of multi-resistance. The objective of this study was to evaluate the synergy of β -lapachone with conventional antimicrobial agents and their activity on virulence factors. Initially were assayed ten strains of *Pseudomonas aeruginosa* with predetermined resistance phenotype. Of these four strains (LFBM 01, LFBM 02, LFBM 16, LFBM 18) presented one to ciprofloxacin resistance profile, meropenem and cefepime hydrochloride and therefore were selected for this study. To verify the synergistic effect between the β -lapachone and antimicrobial agents, was used the checkerboard method. The criteria used to evaluate the synergistic activity were defined by the Index of Fractional Inhibitory Concentration (FIC index). From the top of the FIC index values for β -lapachone / associations antimicrobial activity of these were evaluated for the production of pyocyanin and biofilm. The FIC index values ranged from 0.12 to 0.50 indicating a synergistic interaction for most organizations. The percentage reduction in biofilm formation was above 70% for all associations, except for β -lapachone / meropenem front strain LFBM 18. The percentage reduction in pyocyanin production ranged from 89% to 98.9% and 36 to 69.9% for the association of β -lapachone with cefepime hydrochloride and meropenem respectively.

Key words: *Pseudomonas aeruginosa*. β -lapachone. Synergism. Biofilm. Pyocyanin

INTRODUÇÃO

A falta de critérios na utilização da antibioticoterapia levou ao aparecimento de bactérias resistentes, isto por que os antibióticos exercem uma pressão seletiva nas populações bacterianas e quando utilizados de forma inadequada favorecem o surgimento de microorganismos multidroga resistentes (MDR) (Davies e Davies, 2010; Chanda e Rakholiya, 2011; Lago et al, 2012; Marceau et al, 2013).

Multirresistência é definida como a falta de sensibilidade a vários antimicrobianos, e o seu crescente aumento, tornou-se um grave problema de saúde pública. A escassez de antimicrobianos eficazes aumenta os índices de morbidade e mortalidade. Os custos para o tratamento das infecções causadas por estes microorganismos patogênicos são também mais elevados (Franco et al, 2009; Nikaido, 2009; Davies e Davies, 2010).

Um dos agentes patogênicos mais relevantes neste cenário é a *Pseudomonas aeruginosa*, este microorganismo apresenta fatores de virulência e mecanismos de resistência que contribuem para a sua patogênese e disseminação. De distribuição ubiquitária, é considerada uma bactéria oportunista que raramente causa infecções em indivíduos saudáveis, porém tem uma estreita relação com infecções nasocomiais graves (Viedma et al 2012, Bassetti et al, 2013).

A pesquisa para o desenvolvimento de novos agentes antimicrobianos clinicamente mais seguros é o objetivo de pesquisa em todo o mundo. Neste sentido extratos de plantas são cada vez mais estudados como fontes de compostos biologicamente ativos (Guimarães et al, 2010; Palmeira et al, 2010; Elaissi et al, 2012; Rodrigues et al, 2012; Costa et al, 2013).

Dentre os diversos compostos de origem natural estudados, tem-se a β -lapachona (3,4-diidro-2,2-dimetil-2H-naftol[1,2- β]pirano-5,6-dione), classificada como uma naftoquinona devido sua estrutura química. Apresenta diversas propriedades biológicas: antifúngicas, antivirais, antitumorais, antiparasitárias e antibacterianas (Ferreira e Souza, 2003; Antunes et al, 2006; Pinto e Castro, 2009; Silva et al, 2009; Macedo et al, 2013).

A β -lapachona apesar de ainda não ser um fármaco, tem importância do ponto de vista científico. O que pode ser demonstrado pelas diversas patentes depositadas e concedidas no últimos anos e também pela existência de alguns ensaios clínicos em fase III para o tratamento do Câncer. Talvez por essa razão a utilização comercial esteja próxima (Ferreira et al, 2010; Cheng et al, 2012).

A escassez de medicamentos convencionais para o tratamento de bactérias multirresistentes, justifica a pesquisa e o interesse da comunidade científica no potencial microbida dos metabólitos secundários (Rodrigues et al, 2012; Costa et al, 2013; Noumedem et al, 2013). Neste contexto a β -lapachona pode representar uma alternativa como um fitofármaco por ser de fácil obtenção e amplamente distribuída na natureza e apresentar atividade antimicrobiana já comprovada (Silva et al, 2009; Macedo et al, 2013).

Desta forma este trabalho objetiva uma avaliação de antimicrobianos em associação com a β -lapachona frente à cepas de *Pseudomonas aeruginosa* multidroga resistentes e a atividade destas sobre a formação de biofilme e produção de piocianina.

MATERIAIS E MÉTODOS

Microorganismos

As cepas de *Pseudomonas aeruginosa* (n=10) utilizadas neste estudo pertencem ao Laboratório de Fisiologia e Bioquímica de Microorganismos do Departamento de Antibióticos da UFPE. Oito cepas foram isoladas de espécimes clínicos (LFBM 01, LFBM 02, LFBM 05, LFBM 06, LFBM 16, LFBM 16, LFBM 17, LFBM 18), uma

isolada de água potável (LFBM 19) e uma cepa de referência da American Type culture collection *P. aeruginosa* ATCC 9027.

Cultura, manutenção e padronização do inóculo

As cepas foram mantidas e estocadas em Agar Mueller-Hinton sob óleo mineral. Para a reativação as culturas foram transferidas para tubos contendo caldo Mueller-Hinton e incubadas a 37° C por 24 horas. Após a reativação as culturas foram padronizadas através de diluições e comparações da suspensão com o tubo 0,5 da escala de Mac Farland que corresponde a 10^8 UFC/mL. Em seguida este inóculo foi semeado em placas de Petri contendo o Ágar cetrimida, meio seletivo para *Pseudomonas aeruginosa*.

A partir da cultura crescida em Ágar cetrimida, três colônias foram inoculadas em caldo Mueller-Hinton a 37°C por 18 horas. Em seguida, uma alíquota de 0,1mL foi transferida para outro tubo contendo caldo Mueller-Hinton e incubada por 3 horas a 37°C. Desta suspensão foi realizada uma diluição de 1:100 ao décimo de forma a obter uma suspensão de concentração de 10^6 UFC/mL.

Agentes antimicrobianos

Meropenem (Laboratório ABL LTDA), ceftazidima pentahidratada (Laboratório Nova Farma LTDA), cloridrato de cefepima (Laboratório Biochemico LTDA), ciprofloxacino (Laboratório Eurofarma), Piperacilina sódica-tazobactam (Laboratório Cellofarma LTDA) e sulfato de polimixina B (Laboratório Quimica Haller) foram os antimicrobianos utilizados neste estudo. Estes foram pesados em balança analítica de precisão de modo a obter uma solução de concentração igual à 4096 µg/mL e solubilizadas em água de injeção.

Os critérios de resistência de *Pseudomonas aeruginosa* foram definidos com base no Clinical Laboratory Standard Institute (CLSI) 2013: meropenem (CIM $\geq 8\mu\text{g/mL}$), ceftazidima pentahidratada (CIM $\geq 32\mu\text{g/mL}$), cloridrato de cefepima (CIM $\geq 32\mu\text{g/mL}$), ciprofloxacino (CIM $\geq 4\mu\text{g/mL}$), Piperacilina-tazobactam (CIM $\geq 128/4\mu\text{g/mL}$) e sulfato de polimixina B (CIM $\geq 8\mu\text{g/mL}$) (CLSI, 2013). A β -lapachona foi obtida no Departamento de Antibióticos da UFPE, com grau de pureza de 99,9%, na forma de cristais alaranjados, que foram solubilizados em um sistema composto por Etanol/tween 80/água destilada na proporção de 1,5/0,5/3,5 v/v.

Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

Para esse teste foram utilizadas microplacas, inicialmente 100 μL de caldo Mueller Hinton foram dispensados em todos os poço. Na primeira linha foram dispensados 100 μL da solução dos antimicrobianos a serem avaliados, e em seguida realizadas diluições sucessivas até a última linha. Em seguida um volume de 5 μL (contendo 10^4 UFC/poço de concentração final) das culturas de *P. aeruginosa* foi distribuído em todos os poços e essa microplaca incubada a 37°C por 18 horas. Após este período de incubação, foi adicionado 20 μL de uma solução aquosa de resazurina (solução reveladora) a 0,02% e a placa foi novamente incubada a 37°C por 2 horas. A coloração rosa indica crescimento bacteriano e a coloração azul indica inibição do crescimento bacteriano. A atividade antimicrobiana do solvente foi também avaliada para assegurar a ausência de uma possível atividade intrínseca sobre os microorganismos.

A Concentração Inibitória Mínima foi definida como a menor concentração capaz de impedir o crescimento bacteriano indicada pela coloração azul.

A partir da CIM previamente definida foram semeados 10 μL dos poços onde não houve crescimento visível. Este semeio foi realizado em placas de Petri contendo o meio

Mueller Hinton sólido e as placas incubadas a 37° C por 18 horas. Após este período, foi avaliado o número de colônias por placa e determinada a concentração bactericida mínima. A CBM foi definida como a menor concentração do antimicrobiano capaz de inviabilizar 99,9% da população bacteriana inicial (CLSI, 2013).

Determinação da Concentração Inibitória Fracionada (*checkerboard*)

Através dos valores obtidos da CIM, foram preparadas soluções dos agentes antimicrobianos e da β -lapachona, todos em caldo Mueller Hinton e de forma a obter concentrações sub-inibitórias que variaram de 0,5 x CIM a 0,0002 x CIM para agentes antimicrobianos e de 0,5 x CIM a 0,0039 x CIM para a β -lapachona. De cada uma das diluições dos agentes antimicrobianos, foram depositados 100 μ L nos poços da placa de microdiluição na orientação vertical e na orientação horizontal foram depositados o mesmo volume de cada uma das diluições da β -lapachona. Em seguida 5 μ L da suspensão bacteriana contendo 10^4 UFC de concentração final/poço foram dispensados em cada poço (Lorian et al, 2005).

O critério de interpretação da interação entre os antimicrobianos e a β -lapachona foi obtido após o cálculo do Índice da Concentração Inibitória Fracionada (FIC index) segundo a equação: (CIM do antimicrobiano associado a β -lapachona / CIM do antimicrobiano) + (CIM da β -lapachona associada ao antimicrobiano / CIM da β -lapachona). Valores de FICI $\leq$ 0,5 foram interpretados como sinergismo total, Valores inseridos entre $0,5 < FICI \leq 0,75$ foram interpretados como sinergismo parcial. Efeito indiferente quando estes valores foram de $0,75 < FICI \leq 2$, e efeito antagônico > 2 (An et al, 2011).

Produção e inibição de biofilme

Para a produção do biofilme de *Pseudomonas aeruginosa* foi utilizado o meio Luria Bertani suplementado com 0,4% de glicose e 0,4% casaminoácidos (Cady et al, 2012). Um inóculo padronizado neste meio foi obtido da mesma forma como descrito anteriormente. Este inóculo foi diluído a 1:100. Alíquotas de 100 µL foram distribuídas em todos os poços das placas de microdiluição. Estas placas foram incubadas a 37° C por 24 horas. Após esse período as culturas foram descartadas e as células aderidas ao poliestireno das placas, lavadas duas vezes com água destilada esterilizada e coradas com 125 µL uma solução de cristal violeta a 0,1%. Estas placas foram postas em repouso por 15 minutos em temperatura ambiente para secar. Em seguida este corante foi descartado e os poços lavados quatro vezes com água destilada esterilizada. As placas foram postas em superfície plana até secar. Para revelação do biofilme formado foram adicionados 125 µL de ácido acético glacial a 30%, e durante 15 min as placas ficaram em repouso em temperatura ambiente. Este volume de 125 µL foi transferido para outra placa e a leitura realizada na leitora de microplacas Biotek® ELx800 em comprimento de onda 550nm, usando o ácido acético glacial a 30% como padrão negativo (O'toolle, 2011).

Para avaliação da inibição do biofilme, foram preparadas soluções dos antimicrobianos e da β-lapachona em concentrações sub-inibitórias tendo por base os resultados do FICI de cada associação (menor FICI). Assim em cada poço foram distribuídos 50 µL do antimicrobiano, 50 µL da β-lapachona e 100 µL da suspensão bacteriana concentrada em 10⁴ UFC . As placas foram incubadas a 37° C por 24 horas. Após este período foi realizado o mesmo procedimento acima descrito para quantificação do biofilme formado. Exceto por um acréscimo em 100 µL nas soluções de cristal violeta e ácido acético glacial.

Produção e inibição da piocianina

Para potencializar a produção de piocianina por *Pseudomonas aeruginosa* foi utilizado o meio BD Pseudomonas Agar P, cuja formulação consiste em bacto peptona 20,0 g /L; cloreto de magnésio 1,4 g /L; sulfato de potássio 10,0 g /L; glicerol 10,0 g /L; pH 7,0 $\pm$ 0,2. Bacto Peptona fornece o carbono e o nitrogênio necessários para o crescimento bacteriano, cloreto de magnésio e glicerol potencializam a produção de piocianina e o sulfato de potássio e inibe a formação de fluoresceína.

As cepas foram inoculadas neste meio, cujo inoculo foi obtido da mesma forma como descrito anteriormente, da cultura padronizada 0,5 mL foi dispensado em 9,5 mL de caldo e incubado a 37° C por 72 horas. Em seguida estas culturas foram centrifugadas por 20 minutos a 4.000 rpm, e um volume de 5 mL do sobrenadante transferido para outro tubo ao qual foi adicionado o mesmo volume de clorofórmio. Esta mistura foi homogenizada em vortex por 30 segundos e novamente centrifugada durante 15 minutos a 4.000 rpm. A fase aquosa foi desprezada e a fase orgânica foi acrescentado 1mL de ácido clorídrico a 0,2 N e homogenizada 30 segundos em vortex e em seguida centrifugada por 15 minutos a 4.000 rpm. Após precipitação das proteínas, o sobrenadante é recolhido e neutralizado com NaOH a 0,04 M. A leitura foi realizada em espectrofotômetro Hewlett Packard 8453 em comprimento de onda de 690nm (Kurachi, 1958; Whooley e McLoughlin, 1982).

A inibição de piocianina seguiu o mesmo protocolo descrito acima. Exceto por: em um tubo contendo 9,0 mL de caldo Bacto Peptona foram depositados 0,25 mL de agente antimicrobiano + 0,25 mL de β -lapachona cujas concentrações sub-inibitórias foram definidas pelo melhor FICI e em seguida 0,5 mL da cultura padronizada (contendo 10^4 UFC/tubo) (Kurachi, 1958; Whooley e McLoughlin, 1982; Essar et al, 1990).

RESULTADOS

Os valores obtidos de CIM/CBM da β -lapachona e dos agentes antimicrobianos sulfato de polimixina B, ceftazidima pentahidratada, piperacilina sódica-tazobactam, cloridrato de cefepima, ciprofloxacino e meropenem estão listados na tabela 1.

β -lapachona apresentou uma CIM que variou entre 160 a 640 $\mu\text{g/mL}$ e CBM entre 640 a 2560 $\mu\text{g/mL}$, dependente da cepa de *P. aeruginosa* avaliada.

Todas as cepas de *P. aeruginosa* apresentaram sensibilidade para o sulfato de polimixina B. A associação piperacilina sódica-tazobactam foi eficaz para todas as cepas exceto para *P. aeruginosa* LFBM 18 cuja CIM foi 128 $\mu\text{g/mL}$ e CBM 512 $\mu\text{g/mL}$.

Neste trabalho foram avaliadas duas cefalosporinas, uma de terceira geração, ceftazidima e outra de quarta geração, cloridrato de cefepima. Esta última mostrou ser eficaz frente a cinco cepas (LFBM 05, LFBM 06, LFBM 15, LFBM 17 e LFBM 19). Os valores encontrados de CBM (2048 $\mu\text{g/mL}$) para cloridrato de cefepima foram os maiores dentre os agentes antimicrobianos avaliados.

Seis cepas LFBM 01, LFBM 02, LFBM 06, LFBM 15, LFBM 16 e LFBM 18 foram resistentes a ciprofloxacino e todas apresentaram valores de CIM igual a 16 $\mu\text{g/mL}$ e CBM entre 32 e 128 $\mu\text{g/mL}$.

Entre os agentes antimicrobianos, o meropenem mostrou ser ineficaz frente as cepas LFBM 01, LFBM 02, LFBM 06, LFBM 15, LFBM 16 e LFBM 18 cuja CIM variou de 16 a 256 $\mu\text{g/mL}$ e CBM 64 a 512 $\mu\text{g/mL}$. Estes valores foram de 2 a 32 vezes superiores aos definidos pelo CLSI, 2013 para caracterizar um microorganismo como resistente a este carbapenêmico.

Quatro cepas LFBM 01, LFBM 02, LFBM 16, LFBM 18 apresentaram um perfil de resistência a ciprofloxacino, meropenem e cloridrato de cefepima e por essa razão foram escolhidas para a próxima etapa deste trabalho.

Associação da β -lapachona com agentes antimicrobianos

Os resultados obtidos para CIM, FIC índice bem como o percentual de redução da CIM das associações da β -lapachona com o meropenem ou com o cloridrato de cefepima estão apresentados na tabela 2.

A atividade sinérgica dessas associações utilizadas em concentrações sub-inibitórias ($\leq 0,5 \times \text{CIM}$) foi demonstrada pelos valores de $\text{FICI} \leq 0.5$, exceto para a cepa LFBM 16 β -lapachona/meropenem cujo FICI foi de 0.56 indicando um sinergismo parcial.

A associação da β -lapachona com os agentes antimicrobianos, reforça a atividade microbicida destes antimicrobianos cujo percentual de redução da CIM foi 75 a 93,7% e 87,5 a 93,7% para o meropenem e cloridrato de cefepima respectivamente.

Para as cepas LFBM 02 e LFBM 18, os valores da CIM do meropenem diminuíram de $\frac{1}{4}$ (de 128 para 32 $\mu\text{g/mL}$ e de 32 para 8 $\mu\text{g/mL}$) quando associadas a β -lapachona. Uma redução de $\frac{1}{8} \times \text{CIM}$ foi observado para a cepa LFBM 01 (256 para 32 $\mu\text{g/mL}$). A cepa LFBM 16 apresentou uma redução de $\frac{1}{16} \times \text{CIM}$ (16 para 1 $\mu\text{g/mL}$).

O cloridrato de cefepima em associação com a β -lapachona reduziu os valores da CIM em $\frac{1}{8} \times \text{CIM}$ para LFBM 02 (128 para 16 $\mu\text{g/mL}$) e LFBM 18 (64 para 8 $\mu\text{g/mL}$), e em $\frac{1}{16} \times \text{CIM}$ para as cepas LFBM 01 e LFBM 16. Associação esta que também revelou o melhor FICI (0.12). Esses resultados são representados através das figuras 1 a 4.

Redução formação biofilme

Os resultados expressos em percentual para a redução na formação de biofilme, frente as cepas LFBM 01, LFBM 02, LFBM 16, estão apresentados na tabela 3. O cálculo deste percentual seguiu a seguinte fórmula: $100 - (\text{DO associação} / \text{DO controle}) \times 100$. Para esta determinação foram utilizados concentrações sub-inibitórias de β -lapachona e antimicrobianos determinadas pelos menores valores de FIC índice que variaram de 0,25 a 0,56 para β -lapachona/meropenem e de 0,12 a 0,18 para β -lapachona/cloridrato de cefepima.

Todas as associações reduziram a formação do biofilme acima de 79,9%.

A cepa LFBM 16 apresentou os maiores valores de percentual de redução para ambas as associações, chegando a quase 100% de inibição. O percentual de redução na formação do biofilme para LFBM 01 foram próximos para as duas associações avaliadas ($p < 0,05$).

Para LFBM 02 a associação β -lapachona/meropenem se mostrou mais eficaz na capacidade de reduzir a formação do biofilme quando comparado a associação β -lapachona/cloridrato de cefepima ($p < 0,05$).

Redução produção de piocianina

Os resultados expressos em percentual da redução na produção de piocianina, pelas cepas LFBM 01, LFBM 02 e LFBM 16 estão apresentados na tabela 4. Para esta determinação também foram utilizadas concentrações sub-inibitórias de β -lapachona e antimicrobianos determinadas pelos menores valores de FIC índice.

A cepa que apresentou o maior percentual de redução na produção de piocianina foi a LFBM 16 na associação da β -lapachona com o cloridrato de cefepima, foi observada uma redução de quase 100%.

Das associações utilizadas neste experimento a associação β -lapachona/cloridrato de cefepima, apresentou percentuais de redução na produção de piocianina que variaram de 89,7% a 98,9% para as cepas de *Pseudomonas aeruginosa* avaliadas. Esses resultados foram superiores aos obtidos para associação β -lapachona/meropenem (36 a 69,9%) ($p < 0,05$).

DISCUSSÃO

Pseudomonas aeruginosa é considerada um agente patogênico oportunista com uma intrínseca característica de apresentar resistência a vários antimicrobianos, característica comum à maior parte dos bacilos Gram negativos não fermentadores (Neves et al, 2011; Breidenstein et al, 2012). Estes bacilos apresentam uma versatilidade metabólica que os permite sobreviver sob condições hóstis (Balasubramanian et al, 2013), e capacidade de adaptação permitindo colonizar rapidamente diferentes *habitats* (Jimenez et al, 2012). De uma forma geral os bacilos Gram negativos não fermentadores, em especial *P. aeruginosa* expressa importantes fatores de virulência e secretam enzimas capazes de bloquear a ação microbicida dos antimicrobianos (Balasubramanian et al, 2013).

A ineficácia dos agentes antimicrobianos usualmente utilizados em clínica faz com que *P. aeruginosa* tenha um papel importante como agente causal de infecções graves e de difícil tratamento em pacientes imunocomprometidos. Este fato implica em custos elevados do tratamento e prolongada hospitalização aumentando assim, a relação entre morbidade e mortalidade e disseminação de infecções nosocomiais (Jimenez et al, 2012; Bassetti et al, 2013).

A necessidade urgente de novos compostos seguros e eficazes para o combate de microrganismos patogênicos resistentes, levou o *Infectious Diseases Society of America*

(IDSA) e várias outras entidades a criação do programa chamado de “10 × '20 *Initiative*.” para desenvolver dez novos antibacterianos até 2020, ou novos derivados a partir dos antimicrobianos já existentes (Bassetti et al, 2013; Boucher et al, 2013).

Como perspectiva de descoberta de novas drogas eficazes, o estudo de metabólitos secundários derivados de plantas ganham destaque, representando uma alternativa inesgotável de compostos bioativos (Macedo et al, 2013). Através de uma nova perspectiva de abordagem: a associação medicamentosa baseada no sinergismo, entre esses compostos e os atuais antimicrobianos disponíveis (Guimarães et al, 2010)

As razões para a combinação de fitoconstituintes com drogas sintéticas são várias: melhoria da biodisponibilidade, facilidade no transporte dessas drogas, melhora da atividade biológica, o que resulta numa terapia mais eficaz (Ulrich-Merzenich, 2014). Essas associações sinérgicas diminuem as concentrações necessárias para se observar o efeito desejado e como consequência os efeitos adversos promovidos pelos fármacos, uma vez que serão utilizados em concentrações menores (Ulrich-Merzenich et al, 2009).

Além disso melhoria nas preparações e padronizações de fitocompostos, tornam esses constituintes cada vez mais seguros (Ulrich-Merzenich et al, 2009).

O efeito sinérgico é decorrente da capacidade que os fitoconstituintes apresentam de modificar a atividade antibiótica pela modulação ou reversão da resistência bacteriana, ou ainda por levarem a novos modos de ações dos fármacos, observando-se como efeito final uma alteração da susceptibilidade dos microrganismos patogênicos para os fármacos (Ulrich-Merzenich et al, 2009; Rodrigues et al, 2012; Costa et al, 2013).

Sartoratto et al, 2004 classifica o potencial antimicrobiano desses compostos bioativos de acordo com os valores de CIM da seguintes forma : compostos cuja CIM foi entre 50 e 500 $\mu\text{g/mL}$ são os que possuem forte atividade; de 600 a 1500 $\mu\text{g/mL}$ de atividade moderada; e acima de 1500 $\mu\text{g/mL}$ com fraca atividade. Nossos resultados corroboram aos de Sartoratto uma vez que a β -lapachona apresentou uma forte atividade para a maioria das cepas com CIM entre 160 e 320 $\mu\text{g/mL}$.

A β -lapachona está inserida no grupo das quinonas, uma classe de metabólitos secundários amplamente distribuídos na natureza, com diferentes arranjos moleculares que conferem funções biológicas variadas. São essenciais para a manutenção do ciclo de vida dos seres vivos, principalmente a nível de cadeia respiratória e fotossíntese, também participam da síntese da vitamina K (Ferreira e Souza, 2003).

É uma naftoquinona, que cada vez mais desperta o interesse dos pesquisadores (Silva et al, 2009). A sua principal característica química é atuar como agente oxidante ou de desidrogenação (Pinto e Castro, 2009). Possui comprovada atividade antitumoral, antiinflamatória, antiparasitária, antiviral e antibacteriana (Ferreira, et al, 2010).

A atividade microbicida da β -lapachona já foi demonstrada em alguns microorganismos patogênicos: *Estafilococcus aureus* metilicina resistente e *Mycobacterium fortuitum* e *M. smegmatis* (Silva et al, 2009; Macedo et al, 2013). No nosso trabalho observamos que a β -lapachona além de funcionar como um antimicrobiano, foi capaz de inibir fatores de virulência importantes na patogenicidade da *P. aeruginosa*.

Sua citotoxicidade é reduzida por alterações moleculares, ou de farmacotécnica a exemplo da obtenção de nanopartículas, as quais não interferem na atividade biológica (Srinivas, et al, 2011; Cheng et al, 2012). Blanco et al (2010) estudou a conjugação com

nanopartículas de β -lapachona para o tratamento do câncer de pulmão e obteve resultados satisfatórios no tocante manutenção de atividade x redução de citotoxicidade.

Desse modo a utilização da β -lapachona como fármaco, seja ele antitumoral ou antimicrobiano se torna mais segura uma vez que uma possível atividade danosa contra as células humanas é minimizada.

A ação da β -lapachona é pelo ciclo redox, iniciado pela redução de elétrons na presença de um substrato quinonoídico, que sofre biorredução enzimática catalisada principalmente por NADPH, gerando semiquinonas instáveis capazes de reagir com o oxigênio molecular transferindo elétrons e produzindo o radical superóxido. Pela ação da enzima superóxido dismutase, o radical superóxido é convertido a peróxido de hidrogênio, que na presença do Fe molecular gera o radical oxidrila (reação de Fenton) (Pinto e Castro, 2009; Ferreira et al, 2010). Todos os radicais formados durante o ciclo redox, são altamente reativos do ponto de vista químico e tem a capacidade de danificar biomoléculas como DNA, lipídios, proteínas, causando danos celulares irreversíveis, por interferir nas vias metabólicas necessárias a sobrevivência bacteriana (Pinto e Castro, 2009).

É provável que o dano decorrente do estresse oxidativo induzido por essa substância no presente trabalho seja capaz de interferir na viabilidade de *P. aeruginosa*, alterando a suscetibilidade aos antimicrobianos e a produção de dois fatores de virulência: a formação de biofilme e a produção de piocianina.

Pereira et al (2006) observou uma indução do estresse oxidativo em várias espécies de estafilococos quando submetidas a ação de naftoquinonas. Estes metabolitos secundários induzem a um aumento nos níveis das proteínas de peso molecular 100, 70,

60 e 10 kDa as quais são consideradas proteínas de choque térmico, biossintetizadas sobre forte estresse celular (Pereira et al, 2006).

Macedo et al (2013) demonstrou uma atividade sinérgica entre a associação da β -lapachona e os antimicrobianos de uso clínico ampicilina, ciprofloxacina, amoxicilina, meropenem e cefoxitina contra cepas de *S. aureus* metilicina resistente. Nesse estudo a β -lapachona demonstrou uma forte atividade antimicrobiana e foi capaz de diminuir a concentração inicial dos antimicrobianos convencionais em pelo menos oito vezes. Nos nossos resultados observamos percentuais de reduções nas concentrações iniciais de CIM dos antimicrobianos que variaram entre 75 a 93,7%.

Nesse estudo, os agentes antimicrobianos avaliados em associação com a β -lapachona, são β -lactâmicos, meropenem e cloridrato de cefepima. Ambos apresentam mecanismos de ação semelhantes: penetram na célula bacteriana através de canais conhecidos como porinas, ligam-se covalente as proteínas de ligação à penicilina e desregulam a formação de peptidoglicano. Inibindo a síntese da parede celular (Endimiani et al, 2008; Papp-Wallace et al, 2011). Mas com diferenças estruturais, meropenem apresenta enxofre na posição C1, e seu anel pentacíclico o torna mais resistente a hidrólise pelas betalactamases (Nukaga et al, 2008). Cloridrato de cefepima apresenta uma cadeia lateral de amino-tiazole e um grupamento metilpirrolidínico que promove uma rápida penetração pela porina (Endimiani et al, 2008).

Nossos resultados demonstraram que a associação β -lapachona/cloridrato de cefepima apresentou uma melhor atividade sinérgica quando comparada a associação β -lapachona/meropenem, diminuindo de oito a dezesseis vezes os valores iniciais de CIM. E quanto menores as concentrações dos fármacos, menores seus efeitos colaterais.

Associações entre β -lapachona e antimicrobianos inibindo a biossíntese de dois fatores de virulência: formação de biofilme e produção de piocianina, também foram avaliados nesse trabalho.

A regulação da expressão dos fatores de virulência em *P. aeruginosa*, é realizada pelo *quorum sensing*. Sistema constituído por moléculas autoindutoras: LuxI, AHLs e PQS (Jimenez et al, 2012). A atividade de fitocompostos sobre esse sistema vem sendo estudada: Chenia, 2013 comprovou o potencial da *Kigelia africana* (família Bignoniaceae) que apresenta naftoquinonas dentre os seus diversos metabolitos secundários em interferir no *quorum sensing* e consequentemente desregular a expressão de fatores de virulência.

O biofilme é constituído por uma comunidade microbiana envolta em substâncias poliméricas extracelulares, e se forma em superfícies bióticas e abióticas. Neste microambiente as bactérias crescem livres da ação do sistema imunológico e dos agentes antimicrobianos. Esta estrutura, e particularmente nos casos de biofilmes formados por *P. aeruginosa*, servem de reservatório de patogenicidade contribuindo para a disseminação da infecção. Quando rompidos de forma controlada, liberam bactérias e novos biofilmes são formados (Bridier et al , 2011; Hwang-Soo e Otto, 2012; Wei e Ma, 2013). Bridier, e colaboradores, 2011, verificou que quantidade de biocida suficiente para eliminar as células do biofilme eram muito superiores as necessárias para eliminar células planctônicas.

A capacidade de inibir a formação de biofilme em bactérias por compostos quinoidicos foi estudada: Coenye et al (2007) observou a capacidade de antraquinonas em inibir a formação de biofilme formados por *Streptococcus mutans*; Rejiniemon et al

(2014) observou que uma fenantrenoquinona inibiu a formação de biofilme em *P. aeruginosa* em 52%.

Rogers et al (2010) comprovou o sinergismo entre compostos derivados do 2-aminoimidazol e antimicrobianos convencionais na dispersão de biofilmes de diversas espécies bacterianas e concluiu que existe a hipótese do composto em questão ser capaz de diminuir a resistência aos antimicrobianos. Resultados semelhantes foram encontrados em nossa pesquisa. As associações β -lapachona/meropenem e β -lapachona/cloridrato de cefepima também foram capazes de reduzir a produção do biofilme de 80,3 – 97,3% e 79,9 – 99,8% respectivamente.

Outro fator de virulência de *P. aeruginosa* é a piocianina uma fenazina que apresenta um grupamento azoto, cuja principal característica é o seu potencial de oxirredução. Esta molécula atua como um transportador de elétrons e seu receptor é o oxigênio (Pierson e Pierson, 2010). Atravessa facilmente as membranas biológicas e oxida seus nucleotídeos NAD(P) e NAD(P)H, e em uma reação em cadeia oxida o antioxidante glutatona e induz a formação de espécies reativas de oxigênio (EROS) (Rada e Leto, 2013). Esse desequilíbrio desregula a produção de ATP, alterando o potencial energético celular (Rada e Leto, 2013). A piocianina em associação com EROS inibe a frequência do batimento ciliar nas células epiteliais das vias aéreas ciliadas. Além de alterar a resposta imunológica, estimulando a síntese de várias moléculas pró-inflamatórias: especialmente interleucina-8 (IL-8) e uma molécula adesão intercelular (ICAM1), que atraem neutrófilos, cuja atividade provoca danos teciduais severos (Rada e Leto, 2013). A lesão tecidual é agravada pela inibição do α 1PI que modula a atividade da serina-protease, e da enzima catalase que degrada o peróxido de hidrogênio. Diversas outras citocinas são produzidas na presença da piocianina, IL-1, IL-6 e TNF- α são responsáveis por estimular o fator de crescimento celular (EGFR), levando ao

crescimento das células epidérmicas, bem como a um aumento da secreção de muco (Rada e Leto, 2013).

Publicações sobre a inibição da produção de piocianina são escassas na literatura, porém Zeng et al, 2011 observou uma significativa diminuição da produção de piocianina testando a combinação dos antimicrobianos convencionais, fosfomicina, estreptomicina, azitromicina, eritromicina, gentamicina, e ciprofloxacina em associação com a molécula 14-alfa-lipoil andrografolide um diterpenóide lactona presente na planta *Andrographis paniculata*. Nossos resultados corroboram aos descritos acima e apresentaram uma redução da produção de piocianina de 36-69% e de 89-98% quando cepas de *P. aeruginosa* foram submetidas as associações β -lapachona/meropenem e β -lapachona/cloridrato de cefepima, respectivamente.

A redução na formação do biofilme e na produção da piocianina, representa um avanço no controle de infecções causadas por *P. aeruginosa*, especialmente em infecções crônicas como nas observadas em pacientes com fibrose cística. Os danos decorrentes da infecção persistente que incapacita estes pacientes, pode ser minimizado ou até mesmo extinto. A β -lapachona foi capaz de promover uma redução significativa na expressão de tais fatores de virulência, representando talvez num futuro próximo uma alternativa no combate e controle de tais infecções, trazendo assim, mais qualidade de vida para os pacientes com esse problema.

Conclusão

A β -lapachona foi capaz de inibir o crescimento de cepas de *P. aeruginosa*, sua associação com o meropenem e o cloridrato de cefepima demonstrou um efeito sinérgico. Essas associações também tiveram efeito sobre fatores de virulência importantes na patogênese desta bactéria. Foi observada uma redução tanto na formação do biofilme

quanto na produção de piocianina. Esses resultados podem servir de base para estudos futuros desta molécula como um potencial agente antimicrobiano contra *P. aeruginosa*.

REFERÊNCIAS

An, J. et al. Antibacterial and synergy of a flavononol rhamnoside with antibiotics against clinical isolates of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). **Phytomedicine.**, v. 18, p. 990–993, 2011.

Antunes, R. et al. Atividade antimicrobiana “in vitro” e determinação da concentração inibitória mínima (CIM) de fitoconstituintes e produtos sintéticos sobre bactérias e fungos leveduriformes. **Revista Brasileira de Farmacognosia.** v. 16, n. 4, p. 517-524, 2006.

Balasubramanian, D. et al, A dynamic and intricate regulatory network determines *Pseudomonas aeruginosa* virulence, **Nucleic Acids Research**, v. 41, n. 1, p.1-20, 2013.

Bassetti, M. et al. New antibiotics for bad bugs: where are we?. **Ann Clin Microbiol Antimicrob.**,v.12, n. 22, 2013.

Blanco, E. et al. β -lapachone micellar nanotherapeutics for Non-Small Cell Lung Cancer Therapy. **Cancer Res.** V.70, n 10, p.3896–3904, 2010.

Boucher, H. et al. 10 × '20 Progress—Development of New Drugs Active Against Gram-Negative Bacilli: An Update From the Infectious Diseases Society of America. **Clin Infect Dis.**, v. 56, n. 12, p. 1685–1694, 2013.

Breidenstein, E. et al, The Lon Protease Is Essential for Full Virulence in *Pseudomonas aeruginosa*, **PLoS ONE**,v.7, p.11, e49123, 2012.

Bridier, A. et al. Dynamics of the Action of Biocides in *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms. **Antimicrob Agents Chemother.**,v. 55, n. 6, p. 2648–2654, 2011.

Cady, N. et al. Inhibition of Biofilm Formation, Quorum Sensing and Infection in *Pseudomonas aeruginosa* by Natural Products-Inspired Organosulfur Compounds. **PLoS One.**, v. 7, n.6, e38492, 2012.

Chanda, S.; Rakholiya,K., Combination therapy: Synergism between natural plant extracts and antibiotics against infectious diseases. **Science against microbial pathogens: communicating current research and technological advances**, A. Mendez-Vilas (Ed), p 520-529, 2011.

Cheng, X. et al. Metabolic Profile, Enzyme Kinetics, and Reaction Phenotyping of β -Lapachone Metabolism in Human Liver and Intestine in Vitro. **Mol. Pharmaceutics.**, v. 9, n.12, p. 3476–3485, 2012.

Chenia HY. Anti-quorum sensing potential of crude *Kigelia africana* fruit extracts. **Sensors (Basel)**. v. 13, n. 3, p. 2802-17, 2013.

CLSI, Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing;Twenty-Third Informational Supplement, **Clinical and Laboratory Standards Institute** V.. 33, n. 1, 2013.

Coenye, T. et al. In Vitro Inhibition of *Streptococcus mutans* Biofilm Formation on Hydroxyapatite by Subinhibitory Concentrations of Anthraquinones Antimicrob Agents **Chemother.**, v.51, e.4 p.1541–1544, 2007

Costa, J. et al, Study of the Interference between *Plectranthus Species* Essential Oils from Brazil and Aminoglycosides. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2013, 7 páginas, 2013.

Davies, J. Davies, D., Origins and Evolution of Antibiotic Resistance. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 74, n. 3, p 417–433, 2010.

Elaissi, A. et al, Chemical composition of 8 *eucalyptus* species' essential oils and the evaluation of their antibacterial, antifungal and antiviral activities, **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v.12, n.81, 2012.

Endimiani, A. et al. Cefepime: a reappraisal in an era of increasing antimicrobial resistance. **Expert Rev Anti Infect Ther.**,v. 6, n. 6, p. 805–824, 2008.

Essar, D. et al. Identification and Characterization of Genes for a Second Anthranilate Synthase in *Pseudomonas aeruginosa*: Interchangeability of the Two Anthranilate Synthases and Evolutionary Implications. **Journal of Bacteriology**, p. 884-900,1990.

- Ferreira, M.; Souza, M. Um panorama atual da química e da farmacologia de naftoquinonas com ênfase na β -lapachona e derivados . **Quim. Nova**, v. 26, n. 3, p. 407-416, 2003.
- Ferreira, S. et al. β -Lapachona: Sua importância em química medicinal e modificações estruturais. **Rev. Virtual Quim.**, v. 2, n. 2, p.140-160, 2010.
- Franco, B. et al, The determinants of the antibiotic resistance process. **Infection and Drug Resistance**, v. 2, p. 1–11, 2009.
- Guimarães, D. et al, Antibióticos: importância terapêutica e perspectivas para a descoberta e desenvolvimento de novos agentes. **Química Nova**, v. 33,n. 3, p. 667-679, 2010.
- Hwang-Soo Joo, H-S.; Otto, M. Molecular basis of in-vivo biofilm formation by bacterial pathogens. **Chem Biol.**, v. 19, n.12, p. 1503–1513, 2012.
- Jimenez, P. et al, The Multiple Signaling Systems Regulating Virulence in *Pseudomonas aeruginosa*, **Microbiol. Mol. Biol. Rev.**, v. 76, n. 1, p 46-65, 2012.
- Kung, H-N. et al. Sulindac Compounds Facilitate the Cytotoxicity of β -Lapachone by Up-Regulation of NAD(P)H Quinone Oxidoreductase in Human Lung Cancer Cells. **PLoS ONE**, v. 9, n. 2; e88122, 2014.
- Kurachi, M.. Studies on the Biosynthesis of Pyocyanine. (II) Isolation and Determination of Pyocyanine.**Bulletin of the Institute for Chemical Research**, v. 36, n. 6, p. 174-187, 1958.
- Lago, V. et al, Attitudes of primary care physicians to the prescribing of antibiotics and antimicrobial resistance: a qualitative study from Spain. **Oxford Journals**, Family Praticce, v.29, n. 3, p. 352–360, 2012.
- Lengua, M. et al. Búsqueda en bases de datos de actividad biológica de moléculas quinoides. **Revista Cubana de Información en Ciencias de la Salud.**, v. 24, n. 4, p. 416-430, 2013.

Lorian, V. Antibiotics in Laboratory Medicine Copyright, Susceptibility Testing of Antimicrobials in Liquid Media. **Lippincott Williams & Wilkins**, Fifth Edition, p 61-143, 2005.

Marceau, A. et al, Protein Interactions in Genome Maintenance as Novel Antibacterial Targets, **PLoS ONE**, v.8, n.3: e58765, 2013.

Macedo, L. et al. β -Lapachone activity in synergy with conventional antimicrobials against methicillin resistant *Staphylococcus aureus* strains. *Phytomedicine*, v. 21, n.1, p. 25-29, 2013.

Neves, P. et al, *Pseudomonas aeruginosa* multirresistente: um problema endêmico no Brasil, **J Bras Patol Med Lab**, v. 47 , n. 4, p. 409-420, 2011.

Nikaido H., Multidrug Resistance in Bacteria, Annual review of biochemistry, **NIH Public Access**, v.78, p.119-146, 2009.

Noumedem, J. et al, Antibacterial activities of the methanol extracts of ten Cameroonian vegetables against Gram-negative multidrug-resistant bacteria, **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v.13, n. 26, 2013.

Nukaga, M. et al. Inhibition of class A beta-lactamases by carbapenems: crystallographic observation of two conformations of meropenem in SHV-1. **J Am Chem Soc.**, v. 130, n.38, p.12656-62, 2008.

O'Toole, G. Microtiter Dish Biofilm Formation Assay. **J Vis Exp.**, v. 47, n. 2437, 2011.

Palmeira, J. et al, Avaliação da atividade antimicrobiana *in vitro* e determinação da concentração inibitória mínima (CIM) de extratos hidroalcoólico de angico sobre cepas de *Staphylococcus aureus*, **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, v. 42, n.1, p. 33-37, 2010.

Papp-Wallace, K. et al. Carbapenems: Past, Present, and Future. **Antimicrob Agents Chemother.**, v. 55, n. 11, p. 4943–4960, 2011.

- Pereira, E. et al. Tabebuia avellanedae naphthoquinones: activity against methicillin-resistant staphylococcal strains, cytotoxic activity and in vivo dermal irritability analysis. **Ann Clin Microbiol Antimicrob.**, v. 5, n. 5, 2006.
- Pinto, A.; Castro, S. The Trypanocidal Activity of Naphthoquinones: A Review. **Molecules**, v. 14, p. 4570-4590, 2009.
- Rada, B.; Leto, T. Pyocyanin effects on respiratory epithelium: relevance in Pseudomonas aeruginosa airway infections. **Trends Microbiol.**, v. 21, n. 2, p. 73–81, 2013.
- Rejiniemon, T. et al. In vitro antimicrobial, antibiofilm, cytotoxic, antifeedant and larvicidal properties of novel quinnone isolated from Aegle marmelos (Linn.) Correa. **Ann Clin Microbiol Antimicrob.**; v.13, e.48, 2014.
- Rodrigues, F. et al, Chemical composition, antibacterial and antifungal activities of essential oil from *Cordia verbenacea* DC leaves. **Pharmacognosy Research**, v.4, n.3, p.161–165, 2012.
- Rogers, S. et al. Synergistic Effects between Conventional Antibiotics and 2-Aminoimidazole-Derived Antibiofilm Agents. **Antimicrob Agents Chemother.** v. 54, n.5, p. 2112–2118, 2010.
- Sartoratto, A. et al. Composition and antimicrobial activity of essential oils from aromatic plants used in Brazil. **Braz. J. Microbiol.**, v. 35, n. 4, 2004.
- Silva, J. et al. In vitro synergic effect of β -lapachone and isoniazid on the growth of Mycobacterium fortuitum and Mycobacterium smegmatis. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v.104, n.4, p. 580-582, 2009.
- Srinivas, P. et al. Cytotoxicity of naphthoquinones and their capacity to generate reactive oxygen species is quenched when conjugated with gold nanoparticles. **Int J Nanomedicine.**, v. 6, p. 2113–2122, 2011.
- Ulrich-Merzenich, G. et al. New perspectives for synergy research with the “omic”-technologies. **Phytomedicine**, v. 16, p. 495–508, 2009.

Ulrich-Merzenich, G. Combination screening of synthetic drugs and plant derived natural products-Potential and challenges for drug development. **Synergy** . v. 1, e. 1, p. 59–69, 2014.

Viedma, E. et al, VIM-2–producing Multidrug-Resistant *Pseudomonas aeruginosa* ST175 Clone, Spain, **Emerging Infectious Diseases**, v.18, n. 8, 2012.

Wei, Q.; Ma,L.. Biofilm Matrix and Its Regulation in *Pseudomonas aeruginosa*. **Int J Mol Sci.**, v. 14, n.10, p. 20983–21005, 2013.

Whooley, M.; McLoughlin, A.. The Regulation of Pyocyanin Production in *Pseudomonas aeruginosa*. **European J Appl Microbiol Biotechnol**, v. 15, p.161-166, 1982.

Zeng, X. et al. Synergistic Effect of 14-Alpha-Lipoyl Andrographolide and Various Antibiotics on the Formation of Biofilms and Production of Exopolysaccharide and Pyocyanin by *Pseudomonas aeruginosa*. **Antimicrob Agents Chemother.**, v. 55, n.6, p. 3015–3017, 2011.

Tabela 1: CIM / CBM de β -lapachona e agentes antimicrobianos contra cepas resistentes a múltiplas drogas *Pseudomonas aeruginosa*

<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	CIM/ CBM ($\mu\text{g/mL}$)							Fenótipo de resistência ¹
	POL B	CAZ	PTZ	CPM	CIP	MER	β -LAP	
ATCC 9027	0,250/0,5	16/ 32	16/64	16/32	0,125/1	0,125/0,50	160/640	CEPA DE REFERÊNCIA
LFBM 01	0,5/1	32/128	32/128	512/2048	16/128	256/512	640/2560	GAT;GEN;CTX
LFBM 02	0,5/1	16/64	16/128	128/1024	16/128	128/256	320/1280	AMI;CFL;CFO
LFBM 05	0,5/1	8/ 32	16/128	16/128	0,125/0,5	0,25/0,50	320/2560	CLO;ATM;SZT
LFBM 06	0,5/1	4/ 32	16/128	16/128	16/32	32/256	640/2560	GEN;CFL;CLO
LFBM 15	0,5/1	8/64	32/256	16/128	16/32	16/64	640/2560	AMI;GAT;LEV
LFBM 16	0,5/1	32/128	32/256	128/256	16/32	16/128	320/2560	CTX;CLO;IMP
LFBM 17	0,250/0,5	4/16	64/512	16/32	0,25/2	4/32	160/1280	TOB;IMP;SZT
LFBM 18	0,5/1	8/ 32	128/512	64/512	16/64	32/256	640/2560	LEV;ATM;IMP
LFBM 19	0,5/1	4/8	16/64	16/128	0,25/2	2/16	320/2560	AMI;IMP;CFZ

CIM: Concentração Inibitória mínima; CBM: Concentração Bactericida Mínima; ATCC: American Type culture collection; LFBM: Laboratório de Fisiologia e Bioquímica de Microorganismos. AMI:Amicacina; ATM: Aztreonam; CIP: Ciprofloxacino; CPM: Cefepime; CAZ: Ceftazidima pentahidratada; CFL:Cefazolina; CFO:Cefoxitina; CTX: Cefotaxime; CLO:Clorafenicol; GAT:Gatifloxacina ;GEN:Gentamicina; IMP:Imipenem; LEV: levofloxacina; MER:Meropenem; POL B: sulfato de polimixina B; PTZ:piperacilina sódica-tazobactam; SZT:Sulfisoxazole; TOB:tobramicina; LEV:levofloxacina; β -Lap: β -lapachona.¹ Fenótipo de resistência determinado pelo método de difusão em disco.

Tabela 2: Associação β -lapachona/meropenen e β -lapachona/cloridrato de cefepima frente a cepas *P. aeruginosa*

<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Associação	CIM Individual ($\mu\text{g/mL}$)	CIM Associação ($\mu\text{g/mL}$)	FIC individual	FICI Index	Interpretação	% redução CIM
LFBM 01	BETA/MER	640/256	80/32	0,125/0,125	0.25	Sinergismo total	87,5/87,5
	BETA/CFP	640/512	40/32	0,062/0,062	0.12	Sinergismo total	93,7/93,7
LFBM 02	BETA/MER	320/128	80/32	0,25/0,25 0,125/0,062	0.50	Sinergismo total	75/75
	BETA/CFP	320/128	20/16		0.18	Sinergismo total	93,7/87,5
LFBM 16	BETA/MER	320/16	160/1	0,062/0,5	0.56	Sinergismo parcial	50/93,7
	BETA/CFP	320/128	20/8	0,062/0,062	0.12	Sinergismo total	93,7/93,7
LFBM 18	BETA/MER	640/32	160/8	0,25/0,25 0,125/0,125	0.50	Sinergismo total	75/75
	BETA/CFP	640/64	80/8		0.25	Sinergismo total	87,5/87,5

CIM: Concentração Inibitória Mínima; FIC: Concentração Inibitória Fracionada; MER:meropenen; CFP: cloridrato de cefepima; BETA: β -Lapachone; LFBM: Laboratório de Fisiologia e Bioquímica de Microorganismos. % redução CIM: CIM droga isolada-CIM drogas associadas x 100/CIM isolada

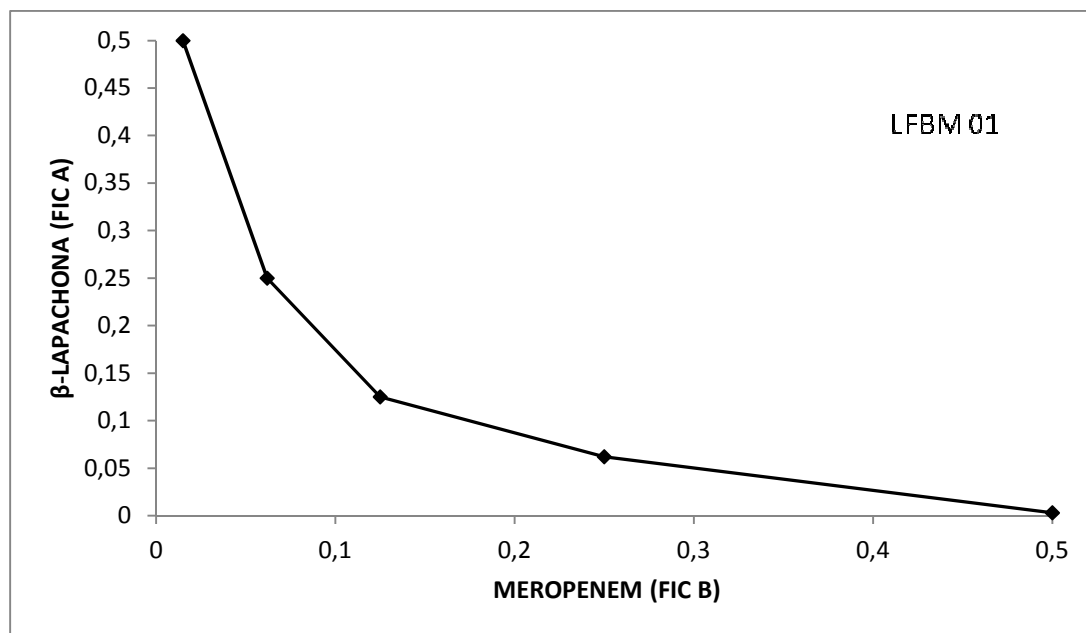


Figura 1: Isoblograma revelando o efeito sinérgico da associação β -lapachona/meropenem frente a *Pseudomonas aeruginosa* LFBM 01

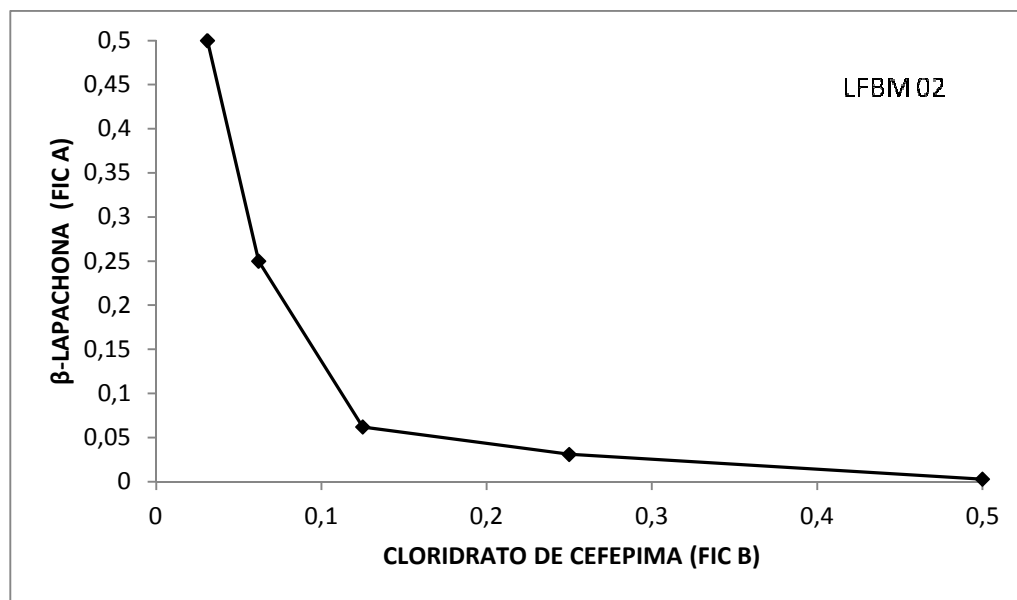


Figura 2: Isoblograma revelando o efeito sinérgico da associação β-lapachona/cloridrato de cefepima frente a *Pseudomonas aeruginosa* LFBM 02

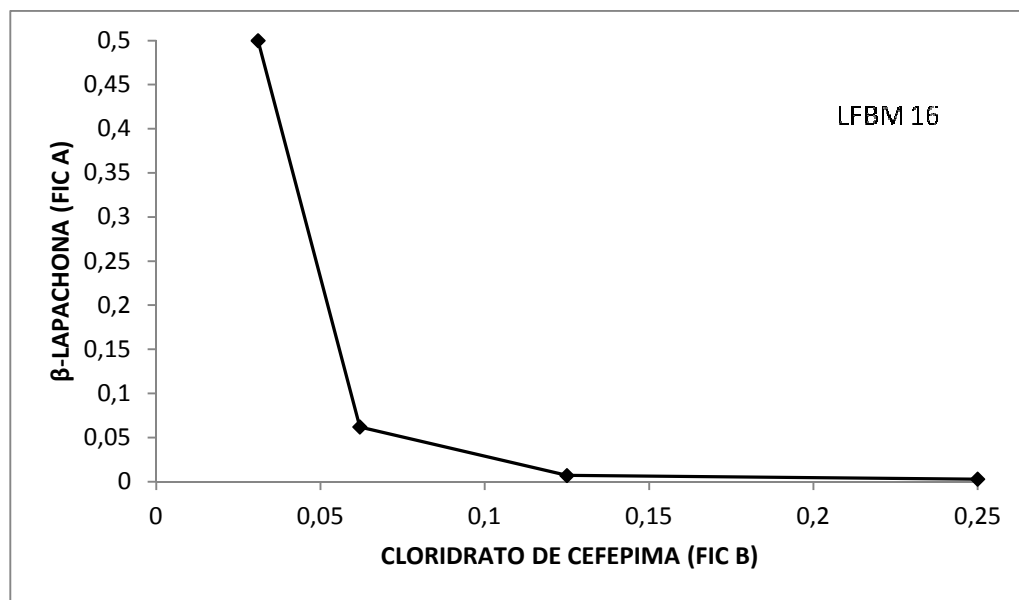


Figura 3: Isoblograma revelando o efeito sinérgico da associação β -lapachona/cloridrato de cefepima frente a *Pseudomonas aeruginosa* LFBM 16

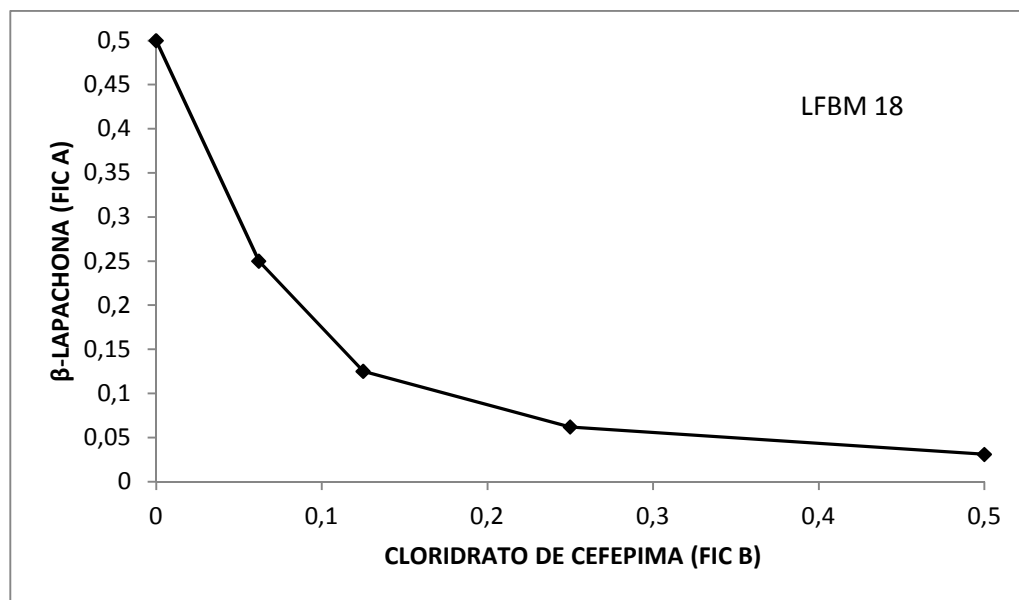


Figura 4: Isoblograma revelando o efeito sinérgico da associação β -lapachona/cloridrato de cefepima frente a *Pseudomonas aeruginosa* LFBM 18

Tabela 3- Percentual de redução na formação do biofilme de *Pseudomonas aeruginosa* após contato com as associações β -lapachona/meropenem e β -lapachona/cloridrato de cefepima

<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	% de redução na formação do biofilme			
	β -lapachona/meropenem		β -lapachona/cloridrato de cefepima	
	CIM Associação ($\mu\text{g/mL}$)	$X \pm \delta$	CIM Associação ($\mu\text{g/mL}$)	$X \pm \delta$
LFBM 01	80/32	$80,3 \pm 0,7$	40/32	$79,9 \pm 1,4$
LFBM 02	80/32	$89,6 \pm 0,8$	20/16	$80,5 \pm 0,8^*$
LFBM 16	160/1	$97,3 \pm 0,1$	20/8	$99,8 \pm 0,0^*$

$X \pm \delta$ = média e desvio padrão; CIM = Concentração Inibitória Mínima.

* diferença significativa entre as associações com a β -lapachona quando comparadas entre si. $p < 0,05$.

Tabela 4- Percentual de redução na produção de piocianina por cepas de *Pseudomonas aeruginosa* após contato com as associações β -lapachona/meropenem e β -lapachona/cloridrato de cefepima

<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	% de redução na produção de piocianina			
	β -lapachona/meropenem		β -lapachona/cloridrato de cefepima	
	CIM Associação ($\mu\text{g/mL}$)	$X \pm \delta$	CIM Associação ($\mu\text{g/mL}$)	$X \pm \delta$
LFBM 01	80/32	$69,8 \pm 0,1$	40/32	$92,6 \pm 1,4^*$
LFBM 02	80/32	$69,9 \pm 1,4$	20/16	$89,7 \pm 0,4^*$
LFBM 16	160/1	$36,0 \pm 2,7$	20/8	$98,9 \pm 0,0^*$

$X \pm \delta$ = média e desvio padrão; CIM = Concentração Inibitória Mínima.

* diferença significativa entre a associação β -lapachona/ cloridrato de cefepima quando comparada a β -lapachona/meropenem

$p < 0,05$.

7. CONCLUSÕES

Foram estudados seis antimicrobianos convencionais, destes apenas o sulfato de polimixina B se mostrou eficaz para todas as cepas de *Pseudomonas aeruginosa* testadas.

A β -lapachona apresentou uma atividade antimicrobiana considerada forte para as cepas LFBM 2, LFBM 5, LFBM 16, LFBM 17, LFBM 19 e ATCC 9020 e moderada para LFBM 1, LFBM 6, LFBM15 e LFBM 18.

O cloridrato de cefepime foi o antimicrobiano que apresentou os maiores valores de CIM e CBM.

Quatro cepas (LFBM 1, LFBM 2, LFBM 16 e LFBM 18) foram resistentes a três classes de antimicrobianos, e escolhidas para avaliação da interação β -lapachona/antimicrobiano.

Todas as interações β -lapachona/meropenem e β -lapachona/cloridrato de cefepima foram sinérgicas, exceto LFBM 16 β -lapachona/meropenem que foi aditiva.

As associações β -lapachona/meropenem e β -lapachona/cloridrato de cefepima foram capazes de reduzir a formação de biofilme em todas as quatro cepas avaliadas.

As associações β -lapachona/meropenem e β -lapachona/cloridrato de cefepima foram capazes de reduzir a produção de piocianina em todas as cepas avaliadas.

8. REFERÊNCIAS

- Akhabue et al, Cefepime-Resistant *Pseudomonas aeruginosa*, **Emerg. Infect.**; 17(6), p 1037–1043, 2011.
- Alain, A. et al. Alterations of OprD in Carbapenem-Intermediate and -Susceptible Strains of *Pseudomonas aeruginosa* Isolated from Patients with Bacteremia in a Spanish Multicenter Study. **Antimicrob Agents Chemother.** v.56, n.4, p.1703–1713, 2012.
- Almeida, E. Preclinical and Clinical Studies of Lapachol and Beta-Lapachone. **The Open Natural Products Journal**, v. 2, p. 42-47, 2009
- Alonso, A. et al. Imaging the early stages of phospholipase C/sphingomyelinase activity on vesicles containing coexisting ordered-disordered and gel-fluid domains. **J Lipid Res.**,v. 52, n.4, p. 635–645, 2011.
- Amiel, E. et al. *Pseudomonas aeruginosa* Evasion of Phagocytosis Is Mediated by Loss of Swimming Motility and Is Independent of Flagellum Expression. **Infect Immun.**,v.78, n.7, p. 2937–2945, 2010.
- An, J. et al. Antibacterial and synergy of aflavononol rhamnoside with antibiotics against clinical isolates of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). **Phytomedicine.**, v. 18, p. 990–993, 2011.
- Andrejko et al, Three *Pseudomonas aeruginosa* strains with different protease profiles, **Acta Biochimica Polonica**, v. 60, n. 1, p. 83–90, 2013.
- Andrejko, M.; Dudka, M., Effect of *Pseudomonas aeruginosa* Elastase B on Level and Activity of Immune Proteins/Peptides of *Galleria mellonella* Hemolymph, **Journal of Insect Science**, v.12, n. 88, 2012.
- Antunes, R. et al. Atividade antimicrobiana “in vitro” e determinação da concentração inibitória mínima (CIM) de fitoconstituintes e produtos sintéticos sobre bactérias e fungos leveduriformes. **Revista Brasileira de Farmacognosia.** v. 16, n. 4, p. 517-524, 2006.

Arai H., Regulation and Function of Versatile Aerobic and Anaerobic Respiratory Metabolism in *Pseudomonas aeruginosa*, **Front Microbiol.**, v. 2, n. 103, 2011.

Arhin, A.; Boucher, C. The outer membrane protein OprQ and adherence of *Pseudomonas aeruginosa* to human fibronectin. **Microbiology.**, v. 156, n. 5, p. 1415-1423, 2010.

Balasubramanian, D. et al, A dynamic and intricate regulatory network determines *Pseudomonas aeruginosa* virulence, **Nucleic Acids Research**, v. 41, n. 1, p.1-20, 2013.

Barbier, F.; Wolff M., Multirésistance chez *Pseudomonas aeruginosa*, **médecine/sciences - Inserm / SRMS**, v. 26, n.11, p. 960-968, 2010.

Bassetti, M. et al. New antibiotics for bad bugs: where are we?. **Ann Clin Microbiol Antimicrob.**,v.12, n. 22, 2013.

Bazire, A.; Dufour, A. The *Pseudomonas aeruginosa* rhlG and rhlAB genes are inversely regulated and RhlG is not required for rhamnolipid synthesis. **BMC Microbiol.**, v.14, n.160, 2014.

Biavatti Maique Weber. Synergy: an ancient wisdom, a new paradigm for pharmacotherapy. **Braz. J. Pharm. Sci.** vol.45 n.3 São Paulo July 2009.

Bleves, S. et al, Quorum Sensing Negatively Controls Type III Secretion Regulon Expression in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, **JOURNAL OF BACTERIOLOGY**, v. 187, n. 11, p. 3898–3902, 2005.

Boucher, H. et al. 10 × '20 Progress—Development of New Drugs Active Against Gram-Negative Bacilli: An Update From the Infectious Diseases Society of America. **Clin Infect Dis.**,; v. 56, n. 12, p. 1685–1694, 2013.

Bouffartigues, E. et al. Transcription of the oprF gene of *Pseudomonas aeruginosa* is dependent mainly on the SigX sigma factor and is sucrose induced. **J Bacteriol.**, v. 194, n. 16, p. 4301–4311, 2012.

Breidenstein, E. et al, The Lon Protease Is Essential for Full Virulence in *Pseudomonas aeruginosa*, **PLoS ONE**,v.7, p.11, e49123, 2012.

Bridier, A. et al. Dynamics of the Action of Biocides in *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms. **Antimicrob Agents Chemother.**, v. 55, n. 6, p. 2648–2654, 2011.

Bucior, I. et al, *Pseudomonas aeruginosa* Pili and Flagella Mediate Distinct Binding and Signaling Events at the Apical and Basolateral Surface of Airway Epithelium. **PLoS Pathog**, v.8, p. 4, e1002616, 2012.

Cady, N. et al. Inhibition of Biofilm Formation, Quorum Sensing and Infection in *Pseudomonas aeruginosa* by Natural Products-Inspired Organosulfur Compounds. **PLoS One.**, v. 7, n.6, e38492, 2012.

Campodónico, V. et al. Evaluation of Flagella and Flagellin of *Pseudomonas aeruginosa* as Vaccines. **Infect Immun.**, v.78, n.2, p. 746–755, 2010.

Chanda, S.; Rakholiya, K., Combination therapy: Synergism between natural plant extracts and antibiotics against infectious diseases. **Science against microbial pathogens: communicating current research and technological advances**, A. Mendez-Vilas (Ed), p 520-529, 2011.

Cheng, X. et al. Metabolic Profile, Enzyme Kinetics, and Reaction Phenotyping of β -Lapachone Metabolism in Human Liver and Intestine in Vitro. **Mol. Pharmaceutics.**, v. 9, n.12, p. 3476–3485, 2012.

Chenia HY. Anti-quorum sensing potential of crude *Kigelia africana* fruit extracts. **Sensors (Basel)**. v. 13, n. 3, p. 2802-17, 2013.

Chiku, K. et al, Defects in D-Rhamnosyl Residue saccharide Structure Motility and Cell-Surface Hydrophobicity in *Pseudomonas syringae* Pathovar *glycinea* Race 4, **Bio sci. Biotechnol. Biochem.**, v.77, n.3, p. 505-510, 2013.

Cho, J. et al, The Novel Biological Action of Antimicrobial Peptides via Apoptosis Induction, **J. Microbiol. Biotechnol.**, v. 22, n.11, p. 1457–1466, 2012.

Chrzanowski, L. et al. Why do microorganisms produce rhamnolipids?. **World J Microbiol Biotechnol.**, v.28, n.2, p. 401–419, 2012.

CLSI, Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Third Informational Supplement, **Clinical and Laboratory Standards Institute** V.. 33, n. 1, 2013.

Coenye, T. et al. In Vitro Inhibition of *Streptococcus mutans* Biofilm Formation on Hydroxyapatite by Subinhibitory Concentrations of Anthraquinones Antimicrob Agents. **Chemother.** v.51, e.4 p. 1541–1544. 2007

Cornelis, P.; Dingemans, J. *Pseudomonas aeruginosa* adapts its iron uptake strategies in function of the type of infections. **Front Cell Infect Microbiol.**, v. 3, n. 75, 2013.

Costa, J. et al, Study of the Interference between *Plectranthus Species* Essential Oils from Brazil and Aminoglycosides. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2013, 7 páginas, 2013.

Damron F.H.; Goldberg J.B., Proteolytic regulation of alginate overproduction in *Pseudomonas aeruginosa*, **Mol Microbiol.**, v.84, n. 4, p. 595-607, 2012.

Damron, F. et al. Genes Required for and Effects of Alginate Overproduction Induced by Growth of *Pseudomonas aeruginosa* on *Pseudomonas* Isolation Agar Supplemented with Ammonium Metavanadate. **J Bacteriol.**, v.195, n.18, p. 4020–4036, 2013.

Das, T. et al. Pyocyanin Facilitates Extracellular DNA Binding to *Pseudomonas aeruginosa* Influencing Cell Surface Properties and Aggregation. **PLoS One.**, v. 8, n. 3, e58299, 2013.

Davies, J. Davies, D., Origins and Evolution of Antibiotic Resistance. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 74, n. 3, p 417–433, 2010.

Davini, M. et al. Role of Vfr in regulating exotoxin A production by *Pseudomonas aeruginosa*. **Microbiology.**, v.155, n.7, p. 2265–2273, 2009.

Deshmukh, D. et al. State of the Globe: Non-Fermenting Gram-Negative Bacilli Challenges and Potential Solutions. **J Glob Infect Dis.** , v.5, n.4, p. 125–126, 2013.

Elaissi, A. et al, Chemical composition of 8 *eucalyptus* species' essential oils and the evaluation of their antibacterial, antifungal and antiviral activities, **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v.12, n.81, 2012.

Endimiani, A. et al. Cefepime: a reappraisal in an era of increasing antimicrobial resistance. **Expert Rev Anti Infect Ther.**,v. 6, n. 6, p. 805–824, 2008.

Eren, E. et al. Substrate Specificity within a Family of Outer Membrane Carboxylate Channels. **PLoS Biol.**, v. 10, n.1, e1001242, 2012.

Essar, D. et al. Identification and Characterization of Genes for a Second Anthranilate Synthase in *Pseudomonas aeruginosa*: Interchangeability of the Two Anthranilate Synthases and Evolutionary Implications. **Journal of Bacteriology**, p. 884-900,1990.

Farha, M. et al, Inhibition of WTA Synthesis Blocks the Cooperative Action of PBPs and Sensitizes MRSA to β -Lactams, **ACS Chem. Biol.**, v.8, n. 1, p 226–233, 2013.

Feala, J. et al. Systems approaches and algorithms for discovery of combinatorial therapies . Wiley Interdiscip. **Rev Syst Biol Med** v.2, p.181-193, 2010.

Fernandes, T. et al, In vitro synergistic effect of *Psidium guineense* (Swartz) in combination with antimicrobial agents against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains, **ScientificWorldJournal**, 2012:158237, 2012.

Ferreira, M.; Souza, M. Um panorama atual da química e da farmacologia de naftoquinonas com ênfase na β -lapachona e derivados . **Quim. Nova**, v. 26, n. 3, p. 407-416, 2003.

Ferreira, S. et al. β -Lapachona: Sua importância em química medicinal e modificações estruturais. **Rev. Virtual Quim.**, v. 2, n. 2, p.140-160, 2010.

Figueiredo, E. et al. *Pseudomonas Aeruginosa*: Frequência de Resistência a Múltiplos Fármacos e Resistência Cruzada entre Antimicrobianos no Recife/PE. **Rev Bras Ter Intensiva.**, v.19, n. 4, 2007.

Fito-Boncompte L, et al. Full virulence of *Pseudomonas aeruginosa* requires OprF. **Infect Immun.**, v.79, n.3, p. 1176–1186, 2011.

Franco, B. et al, The determinants of the antibiotic resistance process. **Infection and Drug Resistance**, v. 2, p. 1–11, 2009.

Franklin, M. et al. Biosynthesis of the *Pseudomonas aeruginosa* Extracellular Polysaccharides, Alginate, Pel, and Psl. **Front Microbiol.**, v.2, n. 167, 2011.

Galle, M. et al, Structure and Function of the Type III Secretion System of *Pseudomonas aeruginosa*, **Current Protein and Peptide Science**, v.13, p. 831-842, 2012.

Garner, A. et al. 3-Hydroxy-1-alkyl-2-methylpyridine-4(1H)-thiones: Inhibition of the *Pseudomonas aeruginosa* Virulence Factor LasB. **ACS Med Chem Lett.**, v.3, n.8, p. 668–672, 2012.

Giltner, C. et al. Type IV Pilin Proteins: Versatile Molecular Modules. **Microbiol Mol Biol Rev.**,v.76, n.4, p. 740–772, 2012.

Glick, R. et al. Increase in Rhamnolipid Synthesis under Iron-Limiting Conditions Influences Surface Motility and Biofilm Formation in *Pseudomonas aeruginosa*. **J Bacteriol.**,v.192, n.12, p. 2973–2980, 2010.

Guimarães, D. et al, Antibióticos: importância terapêutica e perspectivas para a descoberta e desenvolvimento de novos agentes. **Química Nova**, v. 33,n. 3, p. 667-679, 2010.

Guimera, R.; Sales- Pardo, M. A Network Inference Method for Large-Scale Unsupervised Identification of Novel Drug-Drug Interactions. **PLoS Comput Biol** v.9, e.12, 2013.

Hao, Y. et al, Five New Genes Are Important for Common Polysaccharide Antigen Biosynthesis in *Pseudomonas aeruginosa*, **mBio**, v.4, p.1,:e00631-12, 2013.

Heimer, S. et al. *Pseudomonas aeruginosa* Utilizes the Type III Secreted Toxin ExoS to Avoid Acidified Compartments within Epithelial Cells. **PLoS One.**,v.8, n.9, e73111, 2013.

Huang, J. et al, Molecular Characterization of Lipopolysaccharide Binding to Human α -1-Acid Glycoprotein, **Journal of Lipids**, v. 2012, 15 páginas, 2012.

Hussain, H, et al. Lapachol: An overview. **Reviews and Accounts.**, v. 2007, n. 2, p. 145-171, 2007.

Hwang-Soo Joo, H-S.; Otto, M. Molecular basis of in-vivo biofilm formation by bacterial pathogens. **Chem Biol.**, v. 19, n.12, p. 1503–1513, 2012.

Ibarguren, M. et al. End-products diacylglycerol and ceramide modulate membrane fusion induced by a phospholipase C/sphingomyelinase from *Pseudomonas aeruginosa*. **Biochim Biophys Acta.**, v. 98, n. 1, p. 59–64, 2010.

Jimenez, P. et al, The Multiple Signaling Systems Regulating Virulence in *Pseudomonas aeruginosa*, **Microbiol. Mol. Biol. Rev.**, v. 76, n. 1, p 46-65, 2012.

Jin, F. et al, Bacteria use type-IV pili to slingshot on surfaces, **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 108, n. 31, p.12617-12622, 2011.

Karuppiah V.; Derrick J., Structure of the PilM-PilN inner membrane type IV pilus biogenesis complex from *Thermus thermophilus* **J Biol Chem.**, v. 286, n. 27, p. 24434-42, 2011.

Kobayashi, K, et al. Effects of Quinone Derivatives, such as 1,4-Naphthoquinone, on DNA Polymerase Inhibition and Anti-Inflammatory Action. **Medicinal Chemistry**, v. 7, p. 37-44, 2011.

Kohanski, M. et al. How antibiotics kill bacteria: from targets to networks. **Nat Rev Microbiol.**, v.8, n.6, p. 423–435, 2010.

Kuang, Z. et al, *Pseudomonas aeruginosa* Elastase Provides an Escape from Phagocytosis by Degrading the Pulmonary Surfactant Protein-A. **PLoS ONE**, v. 6, p.11: e27091, 2011.

Kumagai, Y. et al. The chemical biology of naphthoquinones and its environmental implications. **Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.**, v. 52, p. 221-247, 2012.

Kung, H-N. et al. Sulindac Compounds Facilitate the Cytotoxicity of β -Lapachone by Up-Regulation of NAD(P)H Quinone Oxidoreductase in Human Lung Cancer Cells. **PLoS ONE**, v. 9, n. 2; e88122, 2014.

Kurachi, M.. Studies on the Biosynthesis of Pyocyanine. (II) Isolation and Determination of Pyocyanine. **Bulletin of the Institute for Chemical Research**, v. 36, n. 6, p. 174-187, 1958.

Lago, V. et al, Attitudes of primary care physicians to the prescribing of antibiotics and antimicrobial resistance: a qualitative study from Spain. **Oxford Journals, Family Practice**, v.29, n. 3, p. 352–360, 2012.

Lengua, M. et al. Búsqueda en bases de datos de actividad biológica de moléculas quinoides. **Revista Cubana de Información en Ciencias de la Salud.**, v. 24, n. 4, p. 416-430, 2013.

Lewis, T. et al. Role for Ferredoxin: NAD(P)H Oxidoreductase (FprA) in Sulfate Assimilation and Siderophore Biosynthesis in Pseudomonads. **J Bacteriol.**, v. 195, n.17, p.3876–3887, 2013.

Liang, H. Et al. Identification of mutants with altered phenazine production in *Pseudomonas aeruginosa*. **J Med Microbiol.**, v. 60 n. 1, p. 22-34, 2011.

Liang, H. et al. Identification of mutants with altered phenazine production in *Pseudomonas aeruginosa*. **J Med Microbiol.**, v. 60, n. 1, p. 22-34, 2011.

Lorian, V. Antibiotics in Laboratory Medicine Copyright, Susceptibility Testing of Antimicrobials in Liquid Media. **Lippincott Williams & Wilkins**, Fifth Edition, p 61-143, 2005.

Lovewell, R. et al, Step-Wise Loss of Bacterial Flagellar Torsion Confers Progressive Phagocytic Evasion. **PLoS Pathog**, v.7,n.9, e1002253, 2011.

Macedo, L. et al. β -Lapachone activity in synergy with conventional antimicrobials against methicillin resistant *Staphylococcus aureus* strains. **Phytomedicine**, v. 21, n.1, p. 25-29, 2013.

Machado, G. et al, Ocorrência e perfil de sensibilidade a antimicrobianos em *Pseudomonas aeruginosa* e *Acinetobacter* sp. em um hospital terciário, no sul do Brasil, **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 44, n. 2, 2011.

Marceau, A. et al, Protein Interactions in Genome Maintenance as Novel Antibacterial Targets, **PLoS ONE**, v.8, n.3: e58765, 2013.

Melzer M.; Welch, C. Outcomes in UK patients with hospital-acquired bacteraemia and the risk of catheter-associated urinary tract infections. **Postgrad Med J.**, v. 89, n.1052, p. 329–334, 2013.

Millan, A. et al. Positive epistasis between co-infecting plasmids promotes plasmid survival in bacterial populations. **The ISME Journal.**, v. 8, p. 601–612, 2014.

Mizel, S.; Bates, J. Flagellin as an Adjuvant: Cellular Mechanisms and Potential. **J Immunol.**, v.185, n.10, p. 5677–5682, 2010.

Morales, E. et al. Hospital costs of nosocomial multi-drug resistant *Pseudomonas aeruginosa* acquisition. **BMC Health Serv Res.**, v.12, n. 122, 2012.

Morimoto, Y.; Minamino, T. Structure and Function of the Bi-Directional Bacterial Flagellar Motor. **Biomolecules.**, v. 4, n.1, p. 217–234, 2014.

Morlon-Guyot, J. et al. Processing of *Pseudomonas aeruginosa* Exotoxin A Is Dispensable for Cell Intoxication. **Infect Immun.**, v.77, n.7, p. 3090–3099, 2009.

Morris, J. et al, Imaging and Analysis of *Pseudomonas aeruginosa* Swarming and Rhamnolipid Production, **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 77, n. 23, p. 8310-8317, 2011.

Nangino, G. Impacto financeiro das infecções nosocomiais em unidades de terapia intensiva em hospital filantrópico de Minas Gerais. **Rev Bras Ter Intensiva.**, v.24, n.4, p. 357-361, 2012.

Neves, P. et al, *Pseudomonas aeruginosa* multirresistente: um problema endêmico no Brasil, **J Bras Patol Med Lab**, v. 47 , n. 4, p. 409-420, 2011.

Nikaido H., Multidrug Resistance in Bacteria, Annual review of biochemistry, **NIH Public Access**, v.78, p.119-146, 2009.

Nogueira, P. et al. Perfil da infecção hospitalar em um Hospital Universitário. **Rev. enferm.**, v. 17, n.1, p. 96-101, 2009.

Noumedem, J. et al, Antibacterial activities of the methanol extracts of ten Cameroonian vegetables against Gram-negative multidrug-resistant bacteria, **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v.13, n. 26, 2013.

Nukaga, M. et al. Inhibition of class A beta-lactamases by carbapenems: crystallographic observation of two conformations of meropenem in SHV-1. **J Am Chem Soc.**, v. 130, n.38, p.12656-62, 2008.

Ochoa, C. et al. *Pseudomonas aeruginosa* Exotoxin Y Is a Promiscuous Cyclase That Increases Endothelial Tau Phosphorylation and Permeability. **J Biol Chem.**, v. 287, n.30, p. 25407–25418, 2012.

Okkotsu, Y. et al. The *Pseudomonas aeruginosa* AlgZR two-component system coordinates multiple phenotypes. **Front Cell Infect Microbiol.**,v.4, n. 82, 2014.

Olufunmiso, O. et al, Synergistic Interactions of Methanolic Extract of *Acacia mearnsii* De Wild. with Antibiotics against Bacteria of Clinical Relevance, **Int. J. Mol. Sci.**, v. 13, p. 8915-8932, 2012.

O'Toole, G. Microtiter Dish Biofilm Formation Assay. **J Vis Exp.**, v. 47, n. 2437, 2011.

Palmeira, J. et al, Avaliação da atividade antimicrobiana *in vitro* e determinação da concentração inibitória mínima (CIM) de extratos hidroalcoólico de angico sobre cepas

de *Staphylococcus aureus*, **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, v. 42, n.1, p. 33-37, 2010.

Papp-Wallace, K. et al. Carbapenems: Past, Present, and Future. **Antimicrob Agents Chemother.**, v. 55, n. 11, p. 4943–4960, 2011.

Parker D.; Prince A., Epithelial Uptake of Flagella Initiates Proinflammatory Signaling. **PLoS ONE**, v.8, n.3: e59932, 2013.

Paul, K. et al. Architecture of the flagellar rotor. **EMBO J.** ,v. 30, n.14, p. 2962–2971, 2011.

Peek, M. et al, Pyoverdine, the Major Siderophore in *Pseudomonas aeruginosa*, **Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases**, v. 2012, Article ID 843509, 10 páginas, 2012.

Pereira, E. et al. Tabebuia avellaneda naphthoquinones: activity against methicillin-resistant staphylococcal strains, cytotoxic activity and in vivo dermal irritability analysis. **Ann Clin Microbiol Antimicrob.**, v. 5, n. 5, 2006.

Pichert, A. et al, Functional aspects of the interaction between interleukin-8 and sulfated glycosaminoglycans, **Biomatter**, v..2, n.3, p.142-148, 2012.

Pierson, L.; Pierson, E.. Metabolism and function of phenazines in bacteria: impacts on the behavior of bacteria in the environment and biotechnological processes. **Appl Microbiol Biotechnol.**, v. 86, n.6, p. 1659–1670, 2010.

Pinto, A.; Castro, S. The Trypanocidal Activity of Naphthoquinones: A Review. **Molecules**, v. 14, p. 4570-4590, 2009.

Pongprayoon, P. et al. Simulations of anion transport through OprP reveal the molecular basis for high affinity and selectivity for phosphate. **Proc Natl Acad Sci.**, v.106, n.51, p. 21614–21618, 2009.

Rada, B.; Leto,T. Pyocyanin effects on respiratory epithelium: relevance in *Pseudomonas aeruginosa* airway infections. **Trends Microbiol.**,v. 21, n.2, p. 73–81, 2013.

Radulovi, N. et al. Antimicrobial Plant Metabolites: Structural Diversity and Mechanism of Action. **Current Medicinal Chemistry**, v. 20, p. 932-952, 2013.

Rehman, Z. et al. Insights into the Assembly of the Alginate Biosynthesis Machinery in *Pseudomonas aeruginosa*. **Appl Environ Microbiol.**, v. 79, n.10, p. 3264–3272, 2013.

Rejiniemon, T. et al. In vitro antimicrobial, antibiofilm, cytotoxic, antifeedant and larvicidal properties of novel quinnone isolated from *Aegle marmelos* (Linn.) Correa. **Ann Clin Microbiol Antimicrob.** v.13, p. 48, 2014.

Reis, R. et al. Gene regulation of rhamnolipid production in *Pseudomonas aeruginosa* – A review. **Bioresource Technology.**, v. 102, n. 11, p. 6377–6384, 2011.

Riley, L. et al, AlgX in alginate acetylation of *Pseudomonas aeruginosa* AlgX: role of Structural and functional characterization, **J. Biol. Chem.**, v. 288, n.31, p.22299-314, 2013.

Rodrigues, F. et al, Chemical composition, antibacterial and antifungal activities of essential oil from *Cordia verbenacea* DC leaves. **Pharmacognosy Research**, v.4, n.3, p.161–165, 2012.

Rogers, S. et al. Synergistic Effects between Conventional Antibiotics and 2-Aminoimidazole-Derived Antibiofilm Agents. **Antimicrob Agents Chemother.** v. 54, n.5, p. 2112–2118, 2010.

Romsang, A. et al. The Iron-Sulphur Cluster Biosynthesis Regulator IscR Contributes to Iron Homeostasis and Resistance to Oxidants in *Pseudomonas aeruginosa*. **PLoS One.**, v. 9, n.1, e86763, 2014.

Sartoratto, A. et al. Composition and antimicrobial activity of essential oils from aromatic plants used in Brazil. **Braz. J. Microbiol.**, v. 35, n. 4, 2004,

Schurr, M. et al. The *Pseudomonas aeruginosa* AlgZR two-component system coordinates multiple phenotypes. **Front Cell Infect Microbiol.**, v.4, n. 82, 2014.

Shrout, J. et al. The contribution of cell-cell signaling and motility to bacterial biofilm formation. **MRS Bull.**, v. 36, n.5, p. 367–373, 2011.

Silva, J. et al. In vitro synergic effect of β -lapachone and isoniazid on the growth of *Mycobacterium fortuitum* and *Mycobacterium smegmatis*. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v.104, n.4, p. 580-582, 2009.

Silva, N.; Fernandes, A. Biological properties of medicinal plants: a review of their antimicrobial activity. **J Venom Anim Toxins incl Trop Dis.**, v. 16, n. 3, 2010.

Sot, J. et al, Recruitment of a phospholipase C/sphingomyelinase into non-lamellar lipid droplets during hydrolysis of lipid bilayers. **Chem Phys Lipids.**; v. 166, p. 12–17, 2013.

Soto, S. Role of efflux pumps in the antibiotic resistance of bacteria embedded in a biofilm. **Virulence.**, v.4, n.3, p. 223–229, 2013.

Srinivas, P. et al. Cytotoxicity of naphthoquinones and their capacity to generate reactive oxygen species is quenched when conjugated with gold nanoparticles. **Int J Nanomedicine.**, v. 6, p. 2113–2122, 2011.

Straatsma, T.; Soares, T. Characterization of the Outer Membrane Protein OprF of *Pseudomonas aeruginosa* in a Lipopolysaccharide Membrane by Computer Simulation. **Proteins.**, v.74, n. 2, p.475–488, 2009.

Strateva, T.; Yordanov, D. *Pseudomonas aeruginosa* – a phenomenon of bacterial resistance. **J Med Microbiol.**, v. 58, n. 9, p.1133-1148, 2009.

Tanom, A. et al, Cloning, Expression and Characterization of Recombinant Exotoxin A-Flagellin Fusion Protein as a New Vaccine Candidate against *Pseudomonas aeruginosa* Infections, **Iranian Biomedical Journal**, v.17, n.1, p.1-7, 2013.

Testa, C.; Johnson, L. A Whole-Cell Phenotypic Screening Platform for Identifying Methylerythritol Phosphate Pathway-Selective Inhibitors as Novel Antibacterial Agents. **Antimicrob Agents Chemother.** v. 56, n. 9, p. 4906–4913, 2012.

Tielen, P. et al. Extracellular enzymes affect biofilm formation of mucoid *Pseudomonas aeruginosa*. **Microbiology.**, v. 156, n. 7, p. 2239-2252, 2010.

Tomaras, A. et al, Adaptation-Based Resistance to Siderophore-Conjugated Antibacterial Agents by *Pseudomonas aeruginosa*. **Antimicrob Agents Chemother.**, v. 57, n.9, p. 4197–4207, 2013.

Toyofuku, M. et al, Social Behaviours under Anaerobic Conditions in *Pseudomonas aeruginosa*, **International Journal of Microbiology**, v. 2012, Article ID 405191, 7 páginas, 2012.

Tran, V. et al. Dynamics of Flagellum- and Pilus-Mediated Association of *Pseudomonas aeruginosa* with Contact Lens Surfaces. **Appl Environ Microbiol.**, v. 77, n.11, p. 3644–3652, 2011.

Truan, D. et al. High-level over-expression, purification, and crystallization of a novel phospholipase C/sphingomyelinase from *Pseudomonas aeruginosa*. **Protein Expr Purif.**, v. 90, n.1, p. 40–46, 2013.

Ulrich-Merzenich, G. et al. New perspectives for synergy research with the “omic”-technologies. **Phytomedicine**, v. 16, p. 495–508, 2009.

Ulrich-Merzenich, G. Combination screening of synthetic drugs and plant derived natural products-Potential and challenges for drug development. **Synergy** . v. 1, e. 1, p. 59–69, 2014.

Vaez, H. et al. Efflux pump regulatory genes mutations in multidrug resistance *Pseudomonas aeruginosa* isolated from wound infections in Isfahan hospitals. **Adv Biomed Res.**, v. 3, n.117, 2014.

Veesenmeyer, J. et al. *Pseudomonas aeruginosa* Virulence and Therapy: Evolving Translational Strategies. **Crit Care Med.**,v. 37, n.5, p. 1777–1786, 2009.

Velkov, T. et al. Pharmacology of polymyxins: new insights into an ‘old’ class of antibiotics. **Future Microbiol.**, v. 8, n.6, 2013.

Verchère, A. et al. In vitro investigation of the MexAB efflux pump from *Pseudomonas aeruginosa*. **J Vis Exp.**, v.84, n. 50894, 2014.

Viedma, E. et al, VIM-2-producing Multidrug-Resistant *Pseudomonas aeruginosa* ST175 Clone, Spain, **Emerging Infectious Diseases**, v.18, n. 8, 2012.

Wargo, M. Choline Catabolism to Glycine Betaine Contributes to *Pseudomonas aeruginosa* Survival during Murine Lung Infection. **PLoS One.**, v. 8, n.2,e56850, 2013.

Wargo, M. et al. Hemolytic Phospholipase C Inhibition Protects Lung Function during *Pseudomonas aeruginosa* Infection. **Am J Respir Crit Care Med.**,v.184, n.3, p. 345–354, 2011.

Wei, Q.; Ma,L.. Biofilm Matrix and Its Regulation in *Pseudomonas aeruginosa*. **Int J Mol Sci.**, v. 14, n.10, p. 20983–21005, 2013.

Whooley, M.; McLoughlin, A.. The Regulation of Pyoverdinin Production in *Pseudomonas aeruginosa*. **European J Appl Microbiol Biotechnol**, v. 15, p.161-166, 1982.

Xavier, D. et al, Efflux pumps expression and its association with porin down-regulation and β -lactamase production among *Pseudomonas aeruginosa* causing bloodstream infections in Brazil, **BMC Microbiology**, v. 10, n. 217, 2010.

Yin, Y. et al. Evidence for Sigma Factor Competition in the Regulation of Alginate Production by *Pseudomonas aeruginosa*. **PLoS One.**, v. 8, n.8, e72329, 2013.

Zeng, X. et al. Synergistic Effect of 14-Alpha-Lipoyl Andrographolide and Various Antibiotics on the Formation of Biofilms and Production of Exopolysaccharide and Pyocyanin by *Pseudomonas aeruginosa*. **Antimicrob Agents Chemother.**, v. 55, n.6, p. 3015–3017, 2011.