



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE BIOCIÊNCIAS
PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA E FISIOLOGIA

MARÍLIA MARTINS MANTA

**ASSOCIAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS E ANTIBIÓTICOS NO
CRESCIMENTO E BIOFILME DE *Enterococcus faecalis* MULTIDROGA
RESISTENTE**

**Recife
2021**

MARÍLIA MARTINS MANTA

**ASSOCIAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS E ANTIBIÓTICOS NO
CRESCIMENTO E BIOFILME DE *Enterococcus faecalis* MULTIDROGA
RESISTENTE**

Dissertação apresentada como requisito parcial para o cumprimento das exigências para obtenção do título de Mestre em Bioquímica e Fisiologia pela Universidade Federal de Pernambuco.

Orientador: Profa. Dra. Maria Tereza dos Santos Correia

Coorientadores: Dr. Túlio Diego da Silva
Dra. Bárbara de Azevedo Ramos

Recife

2021

Catálogo na fonte:
Bibliotecária Claudina Queiroz, CRB4/1752

Manta, Marília Martins

Associação de compostos fenólicos e antibióticos no crescimento e biofilme de *Enterococcus faecalis* multidroga resistente / Marília Martins Manta - 2021.

107 folhas: il., fig., tab.

Orientadora: Maria Tereza dos Santos Correia

Coorientadores: Túlio Diego da Silva

Bárbara de Azevedo Ramos

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Fisiologia. Recife, 2021.

Inclui referências e apêndices.

1. Sinergismo 2. Rutina 3. Quercetina

I. Correia, Maria Tereza dos Santos (Orientadora) II. Silva, Túlio Diego da (Coorientador) III. Ramos, Bárbara de Azevedo (Coorientadora) IV. Título

615.3 CDD (22.ed.)

UFPE/CB-2021-077

MARÍLIA MARTINS MANTA

**ASSOCIAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS E ANTIBIÓTICOS NO
CRESCIMENTO E BIOFILME DE *Enterococcus faecalis* MULTIDROGA
RESISTENTE**

Dissertação apresentada como requisito parcial para o cumprimento das exigências para obtenção do título de Mestre em Bioquímica e Fisiologia pela Universidade Federal de Pernambuco.

Aprovada em: 25 / 02 / 2021

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Maria Tereza dos Santos Correia
Departamento de Bioquímica - Universidade Federal de Pernambuco

Prof. Dr. Thiago Henrique Napoleão
Departamento de Bioquímica - Universidade Federal de Pernambuco

Dra. Bárbara de Azevedo Ramos
Departamento de Antibióticos – Universidade Federal de Pernambuco

Dra. Kátia Alves Ribeiro
Departamento de Bioquímica - Universidade Federal de Pernambuco

Dedico este trabalho a todas as mulheres da minha família. Minhas avós, duas mulheres fortes e guerreiras, minha mãe, irmã, tias e primas.

Vocês são minha força e inspiração.

AGRADECIMENTOS

À toda minha família e, principalmente, minha mãe, meu pai, minha irmã e meu cunhado. Por acreditarem sempre em mim, torcerem por mim e serem o apoio para eu seguir tranquila meu caminho e minhas escolhas. Obrigada por serem minha base. Ter o apoio diário de vocês (mesmo nos pequenos gestos) é fortalecedor e encorajador.

À Ana, minha namorada, pelo companheirismo e parceria. Por sempre acreditar em mim e apoiar as minhas decisões. Pelas distrações, pelas escutas, pelos abraços e conselhos. Pela amizade, além de tudo, que foi fundamental para eu chegar até aqui e querer ir mais longe.

À minha orientadora, Profa. Tereza, que me acolheu desde a graduação e segue acolhendo. Obrigada pela disponibilidade, pelas orientações e, principalmente, por sempre confiar em mim e no meu trabalho.

Ao meu coorientador, Dr. Túlio, por todo o aprendizado, ajuda, conselhos, por torcer comigo e sempre acreditar em mim mesmo diante de algumas dificuldades. Meus sinceros agradecimentos.

À Bárbara, também coorientadora, por me acolher desde o meu primeiro dia no Biomol e estar do meu lado desde então. Seus ensinamentos, conselhos, suporte e, principalmente, amizade, foram fundamentais para chegar até aqui. Obrigada por se doar tanto por mim e por sempre acreditar no meu potencial.

A todos os meus amigos que sempre torcem por mim, entendem minhas ausências e estão sempre ao meu lado. Pelas conversas, puxões de orelha, descontrações e risadas. Sem vocês eu não chegaria tão longe.

À FACEPE por todo auxílio e suporte financeiro desde a graduação.

Ao Departamento de Bioquímica e à Universidade Federal de Pernambuco. Sabemos que a luta pelo ensino público e de qualidade é grande e, nos últimos anos, mais difíceis. Mas a força dos estudantes, professores, servidores e gestores permite que a Universidade siga grande e com sua qualidade. De toda sua estrutura são formados os alunos e futuros profissionais, e eu tenho orgulho de ser fruto dela. Sigamos!

Meu muito obrigada a todos por ajudarem na minha caminhada!

“Simplesmente não desista de tentar fazer o que você realmente quer fazer.

Onde tem amor e inspiração, não tem como dar errado.”.

Ella Fitzgerald

RESUMO

Enterococcus faecalis é uma bactéria Gram-positiva, que faz parte da microbiota normal do sistema digestivo de humanos e animais, mas é oportunista, podendo vir a causar diversas infecções. No geral, o tratamento de infecções causadas por essa espécie é feito por meio de antibióticos, porém, devido ao uso indiscriminado desses medicamentos, foram surgindo linhagens resistentes. Dentre os diversos mecanismos de sobrevivência, há o desenvolvimento de biofilme, que é a formação de uma comunidade complexa e estruturada de micro-organismos envolvidos por uma matriz de polissacarídeos. Sabendo da resistência aos antibióticos, diversos estudos buscam alternativas para o tratamento das infecções. Uma das alternativas é a associação entre antibióticos e compostos fenólicos. Dessa forma, o objetivo do trabalho foi avaliar a capacidade de formação de biofilme e a presença de genes de virulência em isolados de *E. faecalis* e analisar a atividade antimicrobiana e antibiofilme da quercetina e rutina em combinação com antibióticos. Foram utilizados 12 isolados clínicos e uma cepa padrão cedida pela coleção do Departamento de Antibióticos (UFPEDA 09). Nestas cepas se avaliou a formação de biofilme em meio BHI, segundo o método Cristal Violeta, e a hidrofobicidade celular. Foi analisada a presença dos genes de virulência *esp*, *gelE* e *asa1* pela Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). Três isolados MDR e a cepa padrão foram utilizados para o estudo da associação da quercetina e rutina com ciprofloxacina e gentamicina. Avaliou-se a Concentração Inibitória Mínima (CIM) dos antibióticos e compostos fenólicos e a associação deles no biofilme e crescimento bacteriano. Foi observado que das 13 cepas testadas, 12 formam fortemente biofilme. Além disso, quatro dos isolados possuem o gene *gelE* e oito possuem *esp* e *asa1*, indicando a presença desses genes nas cepas formadoras de biofilme. Não foi encontrado o CIM dos antibióticos nos isolados avaliados até 100µg/mL e da quercetina e rutina até a concentração de 1000µg/mL. Quanto a associação, a quercetina reduziu o crescimento bacteriano em todos os isolados quando em associação com a gentamicina, e em três isolados quando em associação com a ciprofloxacina. A rutina aumentou o crescimento bacteriano em associação com os dois antibióticos. Já a associação na formação do biofilme, a rutina se mostrou mais eficiente, reduzindo a formação de biofilme em três isolados quando em associação com a ciprofloxacina e de dois isolados quando em associação com a gentamicina. Com os resultados, observa-se a presença dos genes de virulência em isolados hospitalares de *E. faecalis*. Nota-se também que mesmo a quercetina e rutina, quando utilizados sozinhos, não tendo efeito contra *E. faecalis*, a combinação com os antibióticos testados teve. Sendo assim, a associação da rutina ou quercetina com gentamicina ou ciprofloxacina reduz o crescimento

bacteriano e a capacidade de formação de biofilme, se tornando uma boa alternativa para a questão da resistência aos antibióticos.

Palavras-chave: CIM. Sinergismo. Rutina. Quercetina. Ciprofloxacina. Gentamicina.

ABSTRACT

Enterococcus faecalis is a Gram-positive bacterium, which is part of the normal microbiota of the digestive system of humans and animals but is opportunistic and can cause several infections. In general, the treatment of infections caused by this species is through antibiotics, however with indiscriminate use these drugs have become resistant. Among the various survival mechanisms, there is the development of biofilm, which is the formation of a complex and structured community of microorganisms involved by a polysaccharide matrix. Knowing the resistance to antibiotics, several studies are looking for an alternative for treatment of infections. One of the alternatives is an association between antibiotics and phenolic compounds. Thus, the objective of the work was to evaluate the capacity of biofilm formation and the presence of virulence genes in *E. faecalis* isolates and to analyze the antimicrobial and antibiofilm activity of quercetin and rutin in combination with antibiotics. 12 clinical isolates and a standard strain provided by the collection of the Department of Antibiotics (UFPEDA 09) were used. In these strains, biofilm formation in BHI medium was evaluated, according to the Violet Crystal method, and cellular hydrophobicity. The presence of the virulence genes *esp*, *gelE* and *asa1* was analyzed by the Polymerase Chain Reaction (PCR). Three MDR isolates and the standard strain were used to study the association of quercetin and rutin with ciprofloxacin and gentamycin. The Minimum Inhibitory Concentration (MIC) of antibiotics and phenolic compounds and their association in biofilm and bacterial growth were evaluated. It was observed that of the 13 strains tested, 12 strongly form biofilm. In addition, four of the isolates have the *gelE* gene and eight have *esp* and *asa1*, indicating the presence of these genes in the biofilm-forming strains. The MIC of antibiotics was not found in the isolates up to 100µg/mL and of quercetin and rutin up to the concentration of 1000µg/mL. As for the association, quercetin reduced bacterial growth in all isolates when combined with gentamycin, and in three isolates when combined with ciprofloxacin. Rutin increased bacterial growth in association with the two antibiotics. In the association in the formation of biofilm, rutin was more efficient, reducing the formation of biofilm in three isolates when in association with ciprofloxacin and in two isolates when in association with gentamycin. With the results, it is observed the presence of virulence genes in hospital isolates of *E. faecalis*. It is also noted that even quercetin and rutin, when used alone, having no effect against *E. faecalis*, the combination with the tested antibiotics had. Thus, the association of rutin or quercetin with gentamycin or ciprofloxacin reduces bacterial growth and the ability to form biofilms, making it a good alternative to the issue of antibiotic resistance.

Keywords: MIC. Synergism. Rutin. Quercetin. Ciprofloxacin. Gentamycin.

LISTA DE FIGURAS

Fundamentação teórica

Figura 1 -	Fatores responsáveis pela adesão da célula planctônica a uma superfície. Fonte: Trentin, et al. (2013).....	19
Figura 2 -	Microscopia das diversas fases da formação do biofilme. (A) célula bacteriana planctônica, visualizada por meio de Microscopia Eletrônica de Transmissão. (B) células bacterianas aderidas na superfície e (C) células formando microcolônias, ambas visualizadas por meio de Microscopia Eletrônica de Varredura. Fonte: adaptado de Watnick e Kolter, (2000).....	20
Figura 3 -	Etapas do desenvolvimento do biofilme: Adesão, formação de microcolônia, maturação e dispersão das células bacterianas. Fonte: Adaptado de Ch'ng et al. (2019).....	21
Figura 4 -	(A) Células enterocócicas, visualizadas por meio de uma microscopia eletrônica. (B) Colônias de <i>E. faecalis</i> crescidas por 24 horas a 37 °C em meio ágar sangue. Fonte: Růžičkova et al. (2020).....	23
Figura 5 -	Fórmula química básica do fenol. Os diversos tipos de fenóis são formados a partir dele. Fonte: Nguyen et al. (2003).....	27
Figura 6 -	Imagens de biofilmes formados por Microscopia Eletrônica de Varredura. (A) biofilme formado de <i>S. aureus</i> . (B) biofilme de <i>S. aureus</i> formado na presença de ácido clorogênico. Fonte: Adaptado de Luís et al. (2013).....	30

Artigo II

Gráfico 1 -	Crescimento bacteriano (%) dos antibióticos isolados (100 µg/mL) e (a) associação da quercetina (1000 µg/mL) com os antibióticos (100 µg/mL); (b) associação da rutina (1000 µg/mL) com os antibióticos (100 µg/mL).....	56
Gráfico 2 -	Formação de biofilme (%) dos antibióticos isolados (100 µg/mL) e (a) associação da quercetina (1000 µg/mL) com os antibióticos (100 µg/mL); (b) associação da rutina (1000 µg/mL) com os antibióticos (100 µg/mL).....	57

LISTA DE TABELAS

Fundamentação teórica

Tabela 1 -	Principais classes de compostos fenólicos presentes em plantas. Fonte: Adaptado de Farah e Donangelo, 2006.....	28
------------	---	----

Artigo I

Tabela 1 -	Resultados obtidos nas análises das cepas testadas.....	41
------------	---	----

Artigo II

Tabela 1 -	Crescimento bacteriano (%) dos isolados com ciprofloxacina e gentamicina a 100 µg/mL.....	54
Tabela 2 -	Crescimento bacteriano (%) na associação da rutina e quercetina (1000 µg/mL) com ciprofloxacina e gentamicina em diferentes concentrações.....	59
Tabela 3 -	Formação de biofilme (%) na associação de rutina e quercetina (1000 µg/mL) com ciprofloxacina e gentamicina em diferentes concentrações.....	60

LISTA DE ABREVIATURAS

AMSH	Adesão microbiana ao solvente hidrofóbico
AHL	Lactonas N-acil-homoserina
BHI	Infusão de Cérebro e Coração
CIM	Concentração Inibitória Mínima
DMSO	<i>Dimethyl Sulfoxide</i>
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DO	Densidade Óptica
EPS	Substância extracelular polimérica
Esp	Proteína de superfície enterocócicas
MALDI-TOF	Ionização por Dessorção a Laser Assistida por Matriz com Analisador por Tempo de Voo
MDR	Multidroga resistente
NaCl	Cloreto de sódio
PBP	Proteína de ligação à penicilina
PCR	Reação em Cadeia Polimerase
PYR	<i>pirrolidonil-β-naftilamida</i>
rRNA	Ácido ribonucleico ribossômico
TBE	Tris-borato EDTA
UFC	Unidade Formadora de Colônia
UFPEDA	Universidade Federal de Pernambuco – Departamento de Antibióticos
UTI	Unidade de Tratamento Intensivo
VRE	<i>Enterococcus</i> resistente à Vancomicina
XDR	Extensivamente resistente

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
1.1	OBJETIVOS	17
1.1.1	Objetivo geral	17
1.1.2	Objetivos específicos	17
2	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	18
2.1	BIOFILME BACTERIANO	18
2.2	O GÊNERO <i>Enterococcus</i>	22
2.2.1	<i>Enterococcus faecalis</i>	25
2.3	COMPOSTOS FENÓLICOS NA INIBIÇÃO DE BIOFILMES BACTERIANOS	26
2.3.1	Utilização de compostos fenólicos em associação com antibióticos contra bactérias	32
3	ARTIGO I – Avaliação da formação de biofilme e presença de genes de virulência em isolados clínicos de <i>Enterococcus faecalis</i>	34
4	ARTIGO II – Associação de antibióticos com rutina e quercetina no crescimento e formação do biofilme de isolados clínicos de <i>Enterococcus faecalis</i>	48
5	CONCLUSÃO	66
	REFERÊNCIAS	67
	APÊNDICE A – CAPÍTULO “CARACTERÍSTICAS E FORMAÇÃO DO BIOFILME BACTERIANO” PUBLICADO NO LIVRO INTERNACIONAL SAÚDE ÚNICA, 2020	78
	APÊNDICE B – CAPÍTULO “<i>Enterococcus faecalis</i>: A ESPÉCIE MAIS VIRULENTE DO GÊNERO” PUBLICADO NO LIVRO INOVAÇÕES EM SAÚDE, 2020	85
	APÊNDICE C – CAPÍTULO “COMPOSTOS FENÓLICOS NA INIBIÇÃO DO BIOFILME BACTERIANO” PUBLICADO NO LIVRO FATORES DE VIRULÊNCIA MICROBIANOS E TERAPIAS EMERGENTES, 2020	94

1 INTRODUÇÃO

Bactérias são encontradas em todos os ambientes, seja no nosso corpo, revestindo a pele, no trato gastrointestinal ou no ambiente em que vivemos. Muitas delas são inofensivas ou até mesmo benéficas, e convivem conosco sem causar nenhum problema. Outras delas são patogênicas, causando infecções que vêm se tornando cada vez mais preocupantes, devido ao aumento da resistência aos antibióticos utilizados na clínica (SANTOS, 2004; BÄUMLER E SPERANDIO, 2016).

Dentre as bactérias patogênicas, podemos citar a *Enterococcus faecalis*, uma Gram-positiva que se apresenta em cocos sozinhos ou aos pares e que são consideradas patógenos humanos oportunistas (CAMPOS et al., 2013). Segundo Fisher e Phillips (2009), aproximadamente 12% das infecções nosocomiais nos Estados Unidos são causadas por *Enterococcus spp.*, sendo *E. faecalis* a espécie mais comum. Muitos enterococos possuem resistência ampla a antibióticos, incluindo as penicilinas, cefalosporinas, aminoglicosídeos, glicopeptídeos, entre outros (BOYNUKARA et al., 2002).

Há diversos mecanismos de adaptação que as bactérias podem sofrer para se tornar mais resistentes, dentre eles há a formação do biofilme (STOODLEY et al., 2002). O biofilme é formado quando as células bacterianas se aderem entre si e a um substrato, e são envolvidas por uma matriz extracelular polimérica produzida por elas. Essa estrutura funciona como um mecanismo de virulência e adaptação da bactéria para se manter viva e infectante no ambiente (MAH, 2012; FLEMMING et al., 2016). De acordo com o “Natural Institutes of Health” aproximadamente 80% das infecções estão associadas a biofilmes, sendo este um fator que aumenta mais ainda a resistência aos antimicrobianos, constituindo infecções crônicas e persistentes nos pacientes hospitalares (JAMAL et al., 2018).

Com a crescente aquisição de resistência aos antibióticos, vários estudos vêm sendo realizados visando novas alternativas contra os microrganismos. Há uma intensa busca pela criação de novos antibióticos, porém, até os dias atuais sem sucesso, e os microrganismos se tornavam cada vez mais resistentes.

Diversos compostos naturais já se mostraram eficazes contra bactérias, agindo em diversos mecanismos distintos. Dentre eles, os compostos fenólicos vêm se mostrando eficazes na inibição do crescimento, de toxinas, de enzimas e da formação de biofilme de espécies bacterianas. Com isso, a ação sinérgica desses compostos naturais com antibióticos já existentes, porém não mais eficazes aos microrganismos, se tornou uma das alternativas mais

promissoras para o desenvolvimento de novos fármacos (CUSHNIE E LAMB, 2005; DOS SANTOS et al., 2015; SILVA et al., 2016).

Estudos mostraram que alguns compostos fenólicos como, por exemplo, quercetina, ácido gálico, rutina e luteolina, em sinergismo com antibióticos de diversas classes, foram eficazes contra o crescimento de *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* e *Enterococcus* sp. Dessa forma, essa combinação se mostra como uma boa alternativa contra bactérias, já que restaura seu efeito em uma bactéria previamente resistente, aumentando a ação dos antibióticos (AMIN et al., 2015; LIMA et al., 2016; SANHUEZA et al., 2017).

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo geral

Avaliar a formação de biofilme dos isolados clínicos de *Enterococcus faecalis* e analisar a atividade antimicrobiana e antibiofilme de compostos fenólicos em combinação com antibióticos.

1.1.2 Objetivos específicos

- Confirmar a identidade dos isolados pela técnica de MALDI-TOF;
- Analisar o perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos;
- Analisar a capacidade de formação de biofilme pelos isolados;
- Avaliar a presença de genes relacionados a virulência nos isolados clínicos (*gelE*, *esp* e *asa1*);
- Identificar as atividades dos compostos fenólicos quercetina e rutina e das combinações com antibióticos, sobre o crescimento bacteriano;
- Avaliar a atividade dos compostos e das combinações com antibióticos na anti-formação do biofilme.

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 BIOFILME BACTERIANO

Bactérias podem viver de forma livre (planctônicas) ou podem, em algum momento, se aderirem à uma superfície, onde passam a serem chamadas de sésseis. Antigamente se achava que as bactérias eram preferencialmente encontradas na forma planctônica, porém, hoje em dia já se sabe que as bactérias têm preferência em se aderir a uma superfície e formar agregados. Essas bactérias aderidas de forma irreversível ao substrato formarão o biofilme (TRENTIN et al., 2013; HENRIQUES et al., 2013).

Segundo Costerton et al. (1999), biofilme é definido como “uma comunidade estruturada de células bacterianas cobertas por uma matriz polimérica autoproduzida e aderentes a uma superfície inerte ou viva”. Desde o século XX os biofilmes são conhecidos e estudados. Porém, apenas próximo à metade do século que houveram publicações de estudos começando a descobrir como o biofilme era formado, sua estrutura e implicações genéticas. Até os dias atuais, muita coisa sobre o biofilme ainda é desconhecida (O'TOOLE et al., 2000; FLEMMING AND WINGENDER, 2010; SATPHATY et al., 2016;).

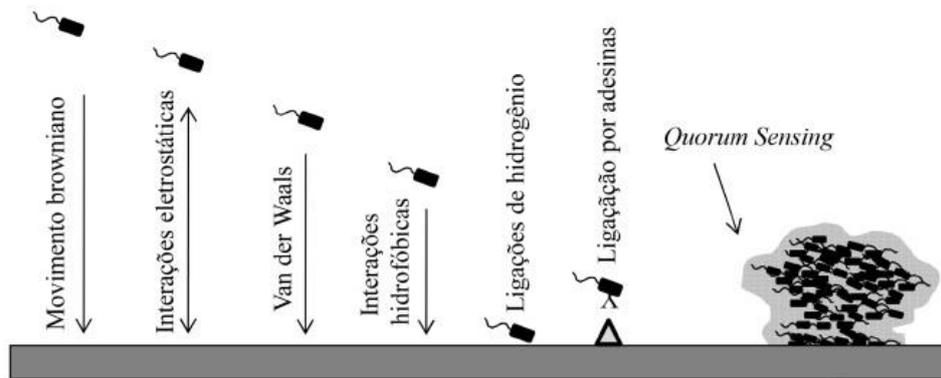
Bactérias e fungos possuem a capacidade de formar biofilmes, sendo os mais estudados e os mais perigosos para a saúde humana formados a partir de bactérias. Ele pode ser desenvolvido em superfícies bióticas ou abióticas, e ser composto por uma única espécie ou por diversas espécies diferentes vivendo em comunidade, estando o primeiro mais presente em infecções e em dispositivos médicos, e o segundo presente nos mais variados ambientes. Há diversos mecanismos distintos que pode levar uma bactéria planctônica a se aderir a uma superfície, havendo influência tanto de fatores ambientais como de fatores genéticos. Tudo isso indica o quanto é complexa a estrutura do biofilme e todo o seu mecanismo de formação (PRATT E KOLTER, 1999; O'TOOLE et al., 2000; SATPHATY et al., 2016).

Há diferença entre os genes expressos por bactérias na forma planctônica com os genes expressos em células formadoras de biofilme. O alginato, por exemplo, que é transcrito pelo gene *algC*, está mais expresso em bactérias presentes no biofilme de *Pseudomonas aeruginosa* (WATNICK E KOLTER, 2000).

De um modo geral, a formação do biofilme possui quatro estágios básicos: uma adesão inicial, formação da microcolônia, maturação do biofilme e dispersão. Na primeira etapa, ocorre a adesão das células planctônicas ao substrato (Figura 1). Essa adesão inicial sofre influência

de diversos fatores físico-químicos como características da superfície celular, movimento dos flagelos, presença de genes e ação de forças de adesão, como Van der Waals, interações eletrostáticas e forças hidrodinâmicas. Nesta etapa, interações hidrofóbicas entre a superfície e a membrana bacteriana têm uma importância fundamental, visto que a maioria dessas estruturas são carregadas negativamente e sofrerão repulsão (DONLAN, 2002; STOODLEY et al., 2002; FLEMMING et al., 2016; REN et al., 2018; CH'NG et al., 2019).

Figura 1. Fatores responsáveis pela adesão da célula planctônica a uma superfície. Fonte: Trentin, et al. (2013).



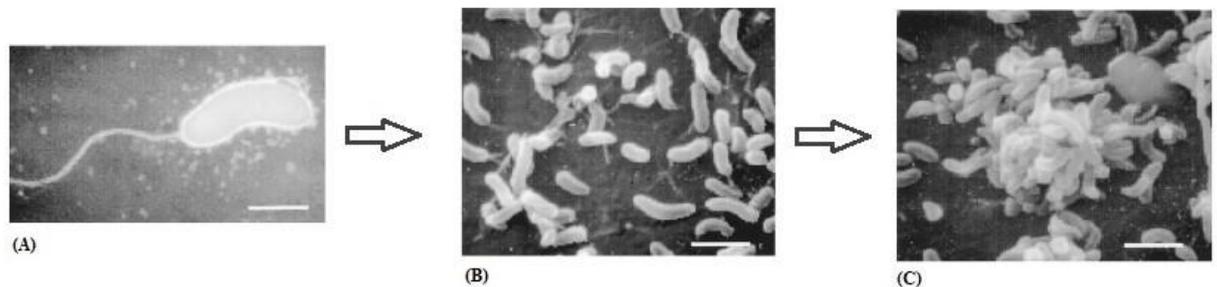
A comunicação bacteriana se dá por meio de um mecanismo conhecido com *Quorum sensing*. Após a adesão, as bactérias que estão agora em maior proximidade uma das outras, secretam compostos metabólicos que funcionam como sinalizadores e reguladores, induzindo a expressão de genes que serão responsáveis pela produção da matriz polissacarídica e que regulam a virulência e a formação do próprio biofilme (STOODLEY et al., 2002; DAVIES, 2003).

Na segunda etapa da formação do biofilme, as bactérias começam também a se multiplicar, formando as microcolônias, como pode ser observado na Figura 2. A matriz, que é chamada de substância extracelular polimérica (EPS, do inglês *exopolysaccharide substance*), é produzida nesta etapa. Tem um papel fundamental para a estruturação do biofilme, pois mantém as bactérias imobilizadas na estrutura. A sua formação é um processo que depende dos nutrientes disponíveis, da secreção de substâncias e do fluxo no ambiente em que o biofilme está se formando. Sua constituição é bastante heterogênea, mas a composição básica e principal é de água, polissacarídeos, proteínas, lipídeos e ácidos nucleicos. No fim, o biofilme é constituído de 10% de células bacterianas e 90% de matriz (WHITCHURCH et al., 2002;

VUONG et al., 2004; FLEMMING E WINGENDER, 2010; FLEMMING et al., 2016; SATPATHY et al., 2016; CH'NG et al., 2019).

A EPS é muito importante para a estabilidade do biofilme e para a defesa contra a resposta imunológica e contra antimicrobianos. Ela vai preencher os espaços entre as células bacterianas no biofilme, determinando a sua arquitetura e imobilizando as células, mantendo-as em maior proximidade e permitindo que haja interação e comunicação entre elas. Funciona também como uma proteção contra a oxidação e contra a desidratação, já que sua estrutura retém a água dentro do biofilme. A arquitetura final estabelecida pela matriz pode variar, e depende de fatores como condições hidrodinâmicas do meio, concentração de nutrientes, motilidade bacteriana e comunicação entre as células (FLEMMING E WINGENDER, 2010; SATPATHY et al., 2016; FLEMMING et al., 2016; CH'NG et al., 2019).

Figura 2. Microscopia das diversas fases da formação do biofilme. (A) célula bacteriana planctônica, visualizada por meio de Microscopia Eletrônica de Transmissão. (B) células bacterianas aderidas na superfície e (C) células formando microcolônias, ambas visualizadas por meio de Microscopia Eletrônica de Varredura. Fonte: adaptado de Watnick e Kolter, (2000).

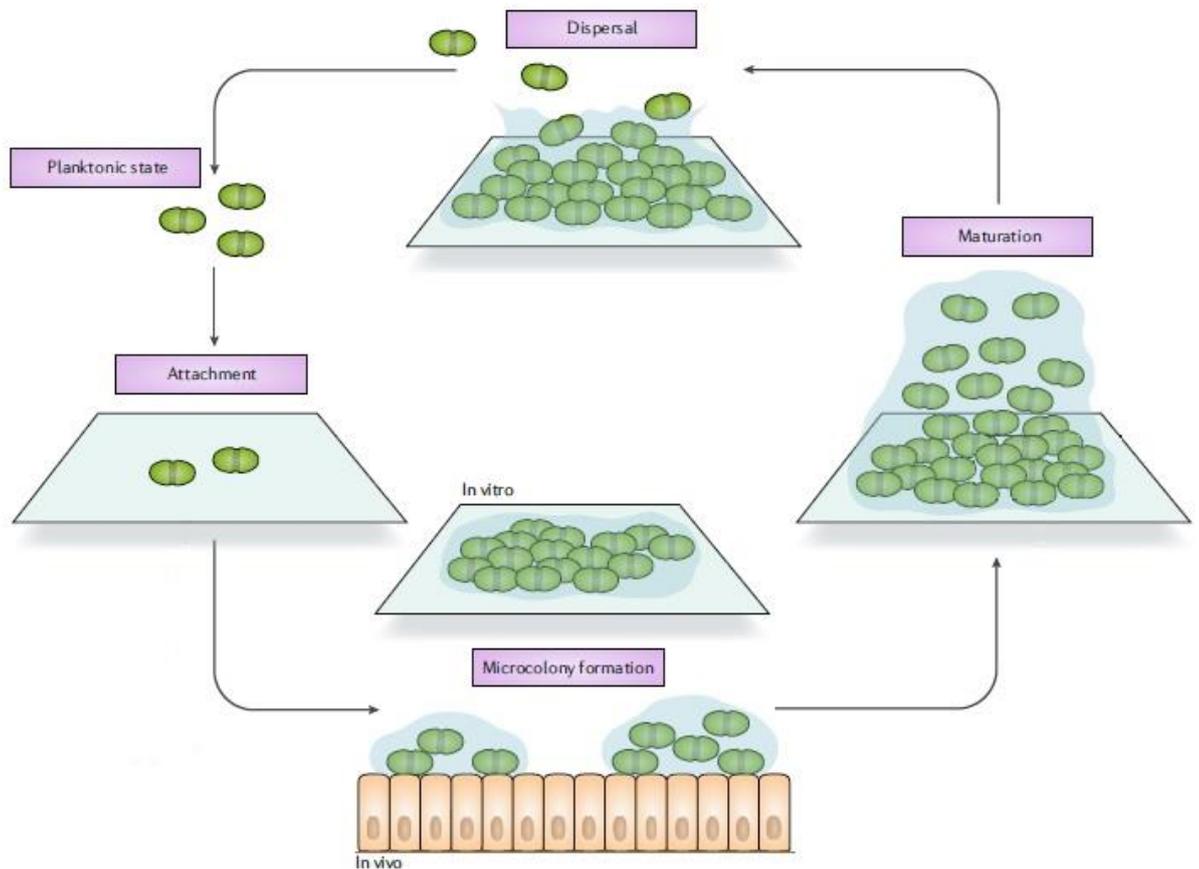


O crescimento do biofilme e a maturação são dependentes do *Quorum sensing*, que leva a um aumento na expressão de componentes, como DNA extracelular, polissacarídeos e proteases extracelulares. A partir do momento que a densidade bacteriana dentro do biofilme vai aumentando, vão se formando estruturas que permitem a sobrevivência dos microrganismos na comunidade, como canais na matriz, que permitem a entrada de nutrientes e água e a saída de metabólitos tóxicos produzidos pelas bactérias (SUBRAMANI E JAYAPRAKASHVEL, 2019 CH'NG et al., 2019).

A última fase da formação do biofilme é a dispersão, onde ocorre liberação de bactérias do biofilme. Essa dispersão é estimulada por diversos fatores como, por exemplo, a redução de nutrientes disponíveis devido ao aumento da densidade bacteriana no biofilme, onde bactérias se dispersam da comunidade para buscar ambientes mais ricos em nutrientes. Estudos também

indicam dispersão a partir do remodelamento da matriz, um processo que ocorre como forma de adaptação dessa estrutura a alterações no meio. Na Figura 3 é possível observar um esquema das fases de formação do biofilme descritas acima (WATNICK E KOLTER, 2000; STOODLEY et al., 2002; FLEMMING et al., 2016).

Figura 3: Etapas do desenvolvimento do biofilme: Adesão, formação de microcolônia, maturação e dispersão das células bacterianas. Fonte: Adaptado de Ch'ng et al. (2019).



Condições no ambiente do biofilme também podem levar a bactéria a produzir novas moléculas que a liberem para o meio, como acontece com biofilmes de *Pseudomonas fluorescens* que, em condições de poucos nutrientes, liberam substâncias que degradam a matriz, levando à dispersão das células em procura de maior disponibilidade de nutrientes. Esta última etapa é de fundamental importância para a manutenção do biofilme, visto que evita que o estoque de nutrientes esgote e as bactérias e toda a estrutura possam ficar fragilizadas. O microrganismo que estava até então na forma sésil, volta ao estado planctônico, podendo voltar a se aderir em algum momento e reiniciar o ciclo (WATNICK E KOLTER, 2000; STOODLEY et al., 2002).

As bactérias que estão presentes no biofilme possuem algumas características que as tornam mais difíceis de erradicar. A matriz, por exemplo, funciona como uma barreira física para proteção contra o sistema imune e para a entrada de antibióticos, de forma que as bactérias conseguem resistir a concentrações até mil vezes maiores da substância, e as infecções se tornam recorrentes. Além disso, as células dentro do biofilme não possuem taxa de crescimento sincronizada, fazendo com que dentro de um mesmo biofilme exista células dormentes e em fases diferentes do ciclo celular, sendo algumas insensíveis a muitos antimicrobianos, principalmente àqueles que agem na multiplicação bacteriana (DONLAN, 2002; STOODLEY et al., 2002; DAVIES, 2003; MOHAMED AND HUANG, 2007; FLEMMING AND WINGENDER, 2010; DELPOZO, 2017).

O biofilme está presente em cerca de 80% das infecções, e as doenças causadas por ele são de difícil tratamento, como endocardite e prostatite crônica. Está relacionado também com a colonização de dispositivos médicos, como cateteres urinários, venosos e arteriais, respiradores e implantes artificiais. As bactérias dentro de um biofilme podem contribuir tanto para a fase crônica da doença, onde é mais difícil de erradicar, quanto para a fase infecciosa, a partir da dispersão das bactérias do biofilme, que podem causar infecções em novos locais. Células presentes nessa estrutura também possuem maior facilidade de adquirir elementos genéticos transmissíveis, devido a uma elevada taxa de conjugação dentro da comunidade, o que acaba facilitando a aquisição de genes de resistência à antibióticos e de virulência. Sendo assim, essa estrutura está relacionada a uma maior sobrevivência do microrganismo e, conseqüentemente, a uma maior patogenicidade (WATNICK E KOLTER, 2000; DONLAN, 2002; DAVIES, 2003; REISNER et al., 2006; MAH, 2012; TRENTIN, 2013).

Estima-se que os biofilmes estejam presentes em cerca de 65% das infecções nosocomiais. Com o conhecimento dos perigos dessa forma de vida à saúde humana, o biofilme vem sendo bastante estudado nos últimos anos. Procura-se entender melhor sua estrutura e os processos de seu desenvolvimento, buscando também compostos antibiofilme, que inibam sua formação ou que consigam degradar a estrutura, podendo tornar as infecções bacterianas mais fáceis de erradicar (SATPATHY et al., 2016)

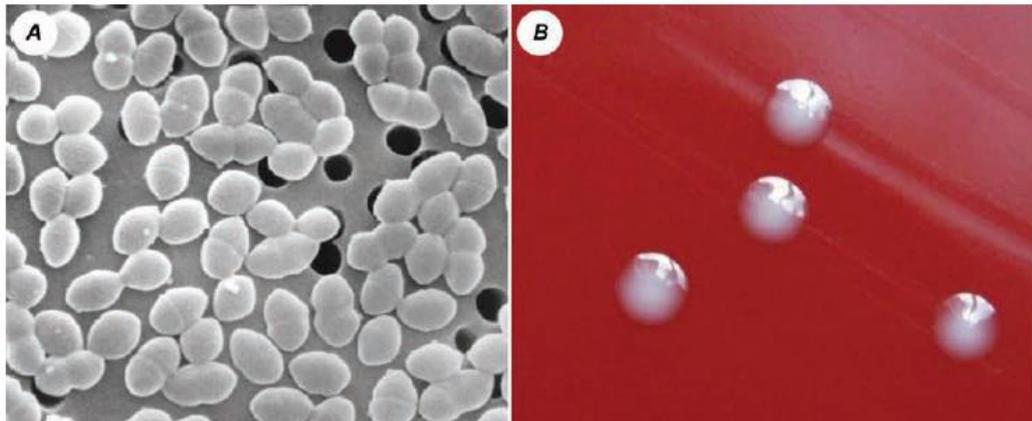
2.2 O GÊNERO *Enterococcus*

Enterococcus já tinha sido relatado desde os anos de 1900. Porém, na época consideravam-no pertencente ao gênero *Streptococcus* devido principalmente às similaridades

morfológicas e bioquímicas, sendo classificados como *Streptococcus* do grupo D. Thiercelin e Jouhaud (1903) citaram *Enterococcus* como um gênero distinto, mas seu estudo não foi muito aceito na época. Em um estudo de Schleifer e Klipper-Balz (1984) eles descobriram, por meio de hibridização DNA-DNA e sequenciamento do 16S rRNA, que as espécies até então conhecidas como *Streptococcus faecium* e *Streptococcus faecalis* eram distintas das outras espécies deste gênero. Após este estudo, essas espécies foram reconhecidas como um gênero diferente, sendo então classificadas, de fato, como *Enterococcus faecium* e *Enterococcus faecalis* (ZHONG et al., 2017; GÁRCIA-SOLACHE E RICE, 2019; RŮŽIČKOVA et al., 2020).

Nos dias atuais, este gênero já é bastante aceito e estudado, com 58 espécies distintas pertencentes a ele (GÁRCIA-SOLACHE E RICE, 2019; RŮŽIČKOVA et al., 2020). Bactérias classificadas como *Enterococcus* spp. são cocos Gram-positivos não esporulados, anaeróbicas facultativas, podendo se apresentar em cadeias ou isolados. Suas colônias são esbranquiçadas quando crescidas em meios tradicionais, mas algumas espécies podem apresentar coloração da colônia mais amarelada (Figura 4). A maioria das espécies não são móveis, com exceção de *E. gallinarum* e *E. casseliflavus*. Quanto à classificação bioquímica, são bactérias ácido-lático positivas, catalase negativas, com crescimento em NaCl 6,5% e hidrólise da bile esculina e PYR positivo. Podem crescer em temperatura variando de 10 a 45 °C, porém sua temperatura ótima é de 35 °C (FIGUEREDO et al., 2016; GÁRCIA-SOLACHE E RICE, 2019).

Figura 4. (A) Células enterocócicas, visualizadas por meio de uma microscopia eletrônica. (B) Colônias de *E. faecalis* crescidas por 24 horas a 37 °C em meio ágar sangue. Fonte: Růžičkova et al. (2020).



Podem ser encontradas em animais, plantas, solo e água. Nos humanos, fazem parte da microbiota principalmente do trato gastrointestinal. No entanto, são considerados organismos oportunistas, e podem vir a causar infecções no trato urinário, em feridas cirúrgicas, bacteremia, endocardite e infecções em cateter e outros dispositivos médicos. As espécies *E. faecalis* e *E.*

faecium são as responsáveis pelas principais infecções enterocócicas, estando presentes em 80% delas (ZHONG et al., 2017; GÁRCIA-SOLACHE E RICE, 2019; RŮŽIČKOVA et al., 2020; TORRES et al., 2018).

Enterococcus spp. vêm se tornando alvo de estudos devido à preocupação com o aumento de infecções, principalmente pelo fato de já serem considerados o segundo maior gênero causador de infecções nosocomiais dentre os Gram-positivos. E o que tornou mais alarmante foi a capacidade de algumas espécies de adquirir resistência a antibióticos utilizados na clínica, tornando as infecções mais difíceis de tratar (GUZMAN PIETRO et al., 2016; REMSCHMIDT et al., 2018; FIGUEREDO et al., 2016; ANVISA, 2019; RŮŽIČKOVA et al., 2020).

Enterococos possuem algumas características que os tornam mais capazes de resistir a antibióticos e os tornam mais virulentos. Resistência intrínseca é uma característica que já está presente no genoma, e a grande maioria das cepas a possuem. *Enterococcus* spp. possuem resistência intrínseca a β -lactâmicos e a baixas concentrações de aminoglicosídeos. A resistência a β -lactâmicos ocorre principalmente devido à expressão de proteínas de ligação à penicilina (PBP, do inglês *penicillin binding protein*) com baixa afinidade, o que dificulta a ação do medicamento. Já a resistência aos aminoglicosídeos ocorre, principalmente, devido à dificuldade do medicamento em acessar o interior da célula bacteriana e, por isso, são utilizados em associação com medicamentos que agem rompendo a parede celular (GUZMAN PRIETO et al., 2016; HEIDARI et al., 2016; GÁRCIA-SOLACHE E RICE, 2019; RŮŽIČKOVA et al., 2020).

A resistência adquirida pode ocorrer principalmente por mutação ou troca de material genético, muitas vezes estimulado por uma necessidade de sobrevivência bacteriana. Uso indiscriminado de antibióticos, pacientes que não terminam corretamente a antibioticoterapia, prescrição de doses insuficientes do antibiótico e a presença de bactérias no ambiente hospitalar podem estimular a aquisição de resistência (FIGUEREDO et al., 2016; RŮŽIČKOVA et al., 2020). A troca do material genético se dá principalmente por meio de plasmídeos ou de transposons. Já foi reportado a aquisição de resistência a algumas classes, como glicopeptídeos, concentrações mais altas de aminoglicosídeos, fluoroquinolonas, linezolid, daptomicina e tetraciclina (HEIDARI et al., 2016; CAVACO et al., 2016; TORRES et al., 2018; GÁRCIA-SOLACHE E RICE, 2019).

Segundo Růžičkova et al. (2020) virulência está representada por uma maior transmissibilidade, toxicidade e invasividade das cepas. Alguns fatores de virulência já são

conhecidos e estão presentes em espécies do gênero *Enterococcus*. As substâncias de agregação, expressas pelo gene *asa1*, estão relacionadas à uma maior capacidade de ligação com a célula do hospedeiro, além de permitirem o contato entre bactérias para a conjugação. As proteínas de superfície enterocócicas (Esp) estão associadas a uma maior capacidade de adesão e, conseqüentemente, formação de biofilme. A gelatinase, expressa pelo gene *gelE*, é uma proteína extracelular capaz de hidrolisar gelatina, caseína e colágeno, estando associada com a invasão bacteriana na célula do hospedeiro. Assim como os genes de resistência, os fatores de virulência também conseguem ser transferidos entre os microrganismos. Dessa forma, cepas que possuem esses fatores causam infecções mais severas do que cepas que não os possuem (WU et al., 2016; HEIDARI et al., 2016; CHAJECKA-WIERZCHOWSKA et al., 2017; SHAFEEK et al., 2018).

Já foi observado a formação de biofilme de enterococos em infecções do trato urinário, de feridas, do trato gastrointestinal e em endocardite. As principais espécies de *Enterococcus* que formam biofilme e causam infecções são *E. faecalis* e *E. faecium*. Enquanto *E. faecalis* é mais virulenta e forma mais biofilmes, *E. faecium* possui resistência a um maior número de antibióticos (HOLMBERG E RASMUSSEN, 2016; CHAJECKA-WIERZCHOWSKA et al., 2017; GARCÍA-SOLACHE E RICE, 2019; CH'NG et al., 2019).

2.2.1 *Enterococcus faecalis*

Enterococcus faecalis é encontrada principalmente no intestino de humanos e de animais, sendo também comumente encontrada no ambiente. Mas, assim como outras espécies de seu gênero, ela tem capacidade de se tornar patogênica. Das espécies do gênero *Enterococcus*, é a mais prevalente em infecções, encontrada em aproximadamente 70% delas. Essa espécie possui grande capacidade de viver em ambientes hostis, com temperaturas variando de 5 a 65 °C e pH entre 4,6 e 9, e altas concentrações de sais. Utiliza principalmente a glicose como fonte de energia, e tem como produto final o ácido láctico (BARROS, 2014; HEIDARI et al., 2016; GUZMÁN PRIETO et al., 2016; BEGANOVIC et al., 2018 GARCÍA-SOLACHE E RICE, 2019; SINGH et al., 2019).

O aumento de infecções causadas por esta espécie ocorre principalmente devido a sua plasticidade genômica e pela capacidade de evolução, onde ocorre transferência de genes, principalmente por meio de plasmídeos e transposons. Devido à alta capacidade de aquisição de resistência, hoje em dia estudos já relataram a presença de isolados de *E. faecalis* multidroga

resistente (MDR) e extensivamente resistente (XDR) (LEBRETON et al., 2017; HIRT et al., 2018; SINGH et al., 2019).

Uma característica importante da espécie, por dificultar o tratamento de suas infecções, é a sua maior capacidade de aderir a superfícies e formar biofilmes. Essa capacidade *in vivo* tem sido bastante relacionada com a presença de alguns genes de virulência, sendo *esp*, *gelE*, *asa1* e *cylA* os mais comumente encontrados em isolados de *E. faecalis*, além de algumas características da espécie como a presença de pilus e de estruturas de superfície celular não proteicas, que facilitam a adesão bacteriana e a formação do biofilme (ZHENG et al., 2017; CH'NG et al., 2019).

2.3 COMPOSTOS FENÓLICOS NA INIBIÇÃO DE BIOFILMES BACTERIANOS

No século XX houve a conhecida “Era de Ouro dos Antibióticos”, iniciada em 1941 com a descoberta de penicilina, seguida até os anos 1990. Houve produção de diversos medicamentos de classes distintas, como β -lactâmicos, tetraciclina, cloranfenicol, aminoglicosídeos, macrolídeos, glicopeptídeos e quinolonas. Eles eram produzidos principalmente a partir de gêneros como *Streptomyces*, *Penicillium*, *Actinomycetes* e *Bacillus* ou de forma sintética e semissintética. Nesta época, quase todas as infecções bacterianas eram tratáveis pelas drogas existentes, sem presença de resistência em larga escala (BBOSA et al., 2014; SILVA et al., 2016; HUTCHINGS et al., 2019).

Porém, desde o fim dessa era, não há descoberta significativa de novos medicamentos e, somado ao uso indiscriminado dos antibióticos e à aquisição de resistência pelas bactérias, a maioria dos fármacos existentes e utilizados hoje em dia já não são mais eficazes contra muitas linhagens bacterianas. Dessa forma, iniciou-se uma busca por compostos originários de plantas que, além de serem abundantes na natureza, produzem metabólitos secundários com diversas propriedades, inclusive com ações contra microrganismos (BBOSA et al., 2014; SILVA et al., 2016; HUTCHINGS et al., 2019).

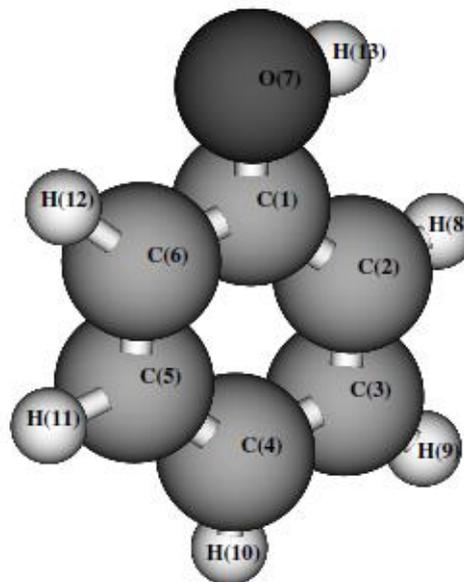
O metabolismo das plantas pode ser classificado como primário e secundário. O primário se refere ao metabolismo básico, comum praticamente a todas as espécies, e que é indispensável para a sua sobrevivência. Já o metabolismo secundário não está envolvido com processos básicos, como obtenção de nutrientes ou geração de energia, e os metabólitos secundários produzidos não existem igualmente entre as espécies e até mesmo entre os tecidos da planta. Devido às suas variadas propriedades biológicas, as substâncias secundárias já são amplamente utilizadas como princípio ativo de diversos produtos, inclusive de alguns

cosméticos e fármacos. Os principais grupos de compostos secundários naturais são os compostos fenólicos, terpenos e substâncias nitrogenadas. Dentre eles, os compostos fenólicos são os mais pesquisados e que mais possuem atividade contra microrganismos (DE REZENDE et al., 2016).

Compostos fenólicos é um termo utilizado para nomear o grupo formado por uma grande quantidade de compostos químicos, caracterizados por ter ao menos um anel aromático (nesse caso, o benzeno) ligado a um grupo hidroxila (Figura 5). É um dos grupos químicos mais comumente encontrado em frutas, vegetais e legumes, e são responsáveis por dar o sabor e a coloração a eles. Nas plantas, são produzidos como metabólitos secundários pelas vias do ácido chiquímico e do acetato malonato, agindo na defesa contra radiação ultravioleta e agressões de patógenos (NGUYEN et al., 2003; CARTEA et al., 2011; FARAH E DONANGELO, 2006).

Figura 5. Fórmula química básica do fenol. Os diversos tipos de fenóis são formados a partir dele.

Fonte: Nguyen et al. (2003).



Compostos fenólicos possuem alguns efeitos fisiológicos como: antialérgico, anti-inflamatório, antimicrobiano, antitrombótico, antioxidante, cardioprotetor e vasodilatador e, por isso, têm recebido cada vez mais atenção da indústria farmacêutica e alimentícia. No nosso plasma, por exemplo, há a presença do α -tocoferol, um fenol constituinte da vitamina E que age como importante antioxidante. Alguns desses compostos têm possível ação também como protetor contra doenças degenerativas crônicas, como catarata, degeneração macular, doenças neurodegenerativas e diabetes mellitus (NGUYEN et al., 2003; FARAH E DONANGELO, 2006; DE REZENDE et al., 2016).

O grupo contém diversos compostos químicos distintos (cerca de oito mil) que variam desde compostos simples, com baixo peso molecular e com apenas um anel aromático para os mais complexos, formando os polifenóis. Os compostos desse grupo podem ser classificados de diversas formas (Tabela 1). Segundo a classificação de Harborne e Simmonds (1964), eles são classificados em grupos distintos de acordo com o número de carbono em sua molécula. Os fenóis encontrados em plantas são classificados principalmente de acordo com o número e arranjo dos átomos de carbono como flavonoides ou não-flavonoides, e em subclasses de acordo com substituições em sua estrutura básica, associação com carboidratos e formação de polímeros (FARAH E DONANGELO, 2006; CARTEA et al., 2011).

Tabela 1. Principais classes de compostos fenólicos presentes em plantas.
Fonte: Adaptado de Farah e Donangelo, 2006.

Classes e sub-classes	Exemplos de compostos
Não-flavonoides	
Ácidos fenólicos	
Ácidos benzoicos	Ácido gálico, ácido protocatecuico, ácido ρ -hidroxibenzóico
Ácidos hidroxicinâmico	Ácido cumárico, ácido cafeico, ácido ferrúlico, ácido sinápico
Taninos hidrolisáveis	Pentagalolil glicose
Estilbenos	Resveratrol
Ligninas	Secoisolariciresinol, matairesinol, lariciresinol, pinoresinol
Flavonoides	
Flavonois	Rutina, quercetina
Flavonas	Apigenina, Luteolina
Flavanonas	Naringerina, hesperetina
Flavanois	Catequinas, galocatequinas
Antocianidinas	Pelargonidina, cianidina, malvadina
Taninos condensados ou proantocianidinas	Procianidina trimérico, prodelfinidinas
Isoflavonas	Daidzeína, genistina, gliciteína

Flavonoides são compostos polifenólicos com quinze átomos de carbono e dois anéis aromáticos ligados por pontes de carbono. Correspondem à maior parte da compostos fenólicos. Estão presentes principalmente em folhas e frutas, e possuem ação na proteção contra raios UV, promovem pigmentação, fixação do nitrogênio e proteção contra pragas. No corpo, os

flavonoides possuem ação antioxidante, anti-inflamatória, anti-mutagênica e anti-carcinogênica (CARTEA et al., 2011; PANCHE et al., 2016).

Diversos compostos naturais já se mostraram eficazes contra bactérias, agindo contra a comunicação bacteriana, contra a motilidade, inibindo toxinas, impedindo a produção enzimática, alterando seu metabolismo ou agindo sobre a formação do biofilme bacteriano. Essas ações acabam levando à morte das bactérias ou podem atrapalhar seu metabolismo, fazendo com que não consigam se multiplicar (KUMAR et al., 2007; SATISH et al., 2008).

Quanto aos compostos fenólicos, especificamente, estudos mostram que eles são bastante eficazes contra mecanismos bacterianos de um modo geral. Cumarinas, flavonoides, ácidos fenólicos e taninos conseguem agir impedindo ou alterando a comunicação por *Quorum sensing* de algumas espécies Gram-positivas e Gram-negativas, como *Serratia marcescens*, *Pseudomonas*, *Staphylococcus aureus* e *Chromobacterium violaceum*. Ligninas, quinonas, fenilpropanoides, cumarina e flavanoides têm ação contra a motilidade bacteriana, que é considerado um fator de virulência muito importante para bactéria, visto que permite que ela colete nutrientes do ambiente e colonize novos lugares (SILVA et al., 2016).

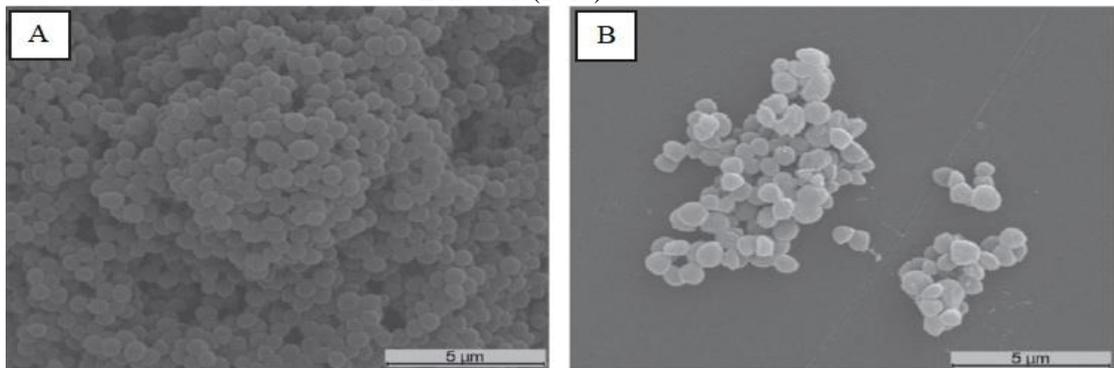
Como mostrou Cartea et al. (2011), no estudo de Ayaz et al. (2008), frações fenólicas ricas em quercetina e derivados de kaempferol se mostraram eficazes contra o crescimento de Gram-positivas e Gram-negativas, como *S. aureus*, *E. faecalis*, *Bacillus subtilis* e *Moraxella catarrhalis*. Além disso, compostos fenólicos já se mostraram eficazes na inibição do crescimento, de toxinas, enzimas e da formação de biofilme de diversas espécies bacterianas (CUEVA et al., 2010; BOUND et al., 2015).

Diversos compostos fenólicos vêm se mostrando eficientes na supressão da formação do biofilme bacteriano de diversas espécies. *S. aureus* é uma Gram-positiva de grande relevância médica, com uma grande patogenicidade, onde suas infecções estão muitas vezes relacionadas com a formação de biofilme, principalmente em dispositivos médicos como válvulas coronarianas, cateteres e próteses. Diversos compostos fenólicos já se mostraram eficazes contra o biofilme desta espécie, como flavonoides, xanthohumol, ácido gálico, proantocianidinas, ácido elágico, ácido tânico e ácido clorogênico, como pode ser visto na Figura 6 (TRENTIN et al., 2015; SLOBODNÍKOVÁ et al., 2016; LIU et al., 2017).

Pseudomonas aeruginosa é um patógeno oportunista Gram-negativo, comumente associado a infecções do trato urinário e do sistema respiratório, e possui a capacidade de formar biofilme nos mais variados ambientes. A formação de biofilme por esse microrganismo está bastante associada a infecções pulmonares e a fibrose cística crônica. Estudos mostram que compostos fenólicos se mostraram eficazes contra o seu biofilme, como a cumarina, catequina,

flavonoides, quercetina, ácido gálico, ácido ferrúlico e ácido tânico (BANIN; VASIL; GREENBERG, 2005; BORGES et al., 2012; SIDDIQUI et al., 2015; PEJIN et al., 2015; ONSARE E ARORA, 2015; URQUHART et al., 2018). *Klebsiella pneumoniae*, também Gram-negativa, é um patógeno comumente associado a infecções hospitalares. Esta bactéria também é forte formadora de biofilme, principalmente em cateteres urinários e outros dispositivos médicos. Estudos mostram que extratos de diversas plantas ricas em flavonoides, ácido gálico, ácido ferúlico, ácido cafeico, ácido elágico, catequina e quercetina se mostraram eficazes contra biofilmes de *K. pneumoniae* (IBRAHIM, 2017; ROY et al., 2018; THININA et al., 2020).

Figura 6. Imagens de biofilmes formados por Microscopia Eletrônica de Varredura. (A) biofilme formado de *S. aureus*. (B) biofilme de *S. aureus* formado na presença de ácido clorogênico. Fonte: Adaptado de Luís et al. (2013).



Enterococcus spp. são Gram-positivos que fazem parte da microbiota da cavidade oral e gastrointestinal. Mesmo presentes no organismo, as espécies desse gênero podem causar infecções no trato urinário, no sangue e até no sistema nervoso. Diversos taninos, quercetina, proantocianidina, catequina e outros flavonoides se mostraram eficazes contra a formação de biofilme de *Enterococcus* (MOHAMED E HUANG, 2007; SILVA et al., 2016; HAKIKI ET AL., 2017; MEMARIANI et al., 2019). *Streptococcus mutans* também é um patógeno Gram-positivo, principalmente associado a formação de biofilme em dentes de animais e humanos, formando placas e cáries. Proantocianidinas, xantonas, ácido tânico, ligninas, ácido gálico, quinonas, ácido salicílico, ácido gálico, metilgalato, quercetina, quercitrina, chalcona e fenóis simples foram alguns dos compostos fenólicos que tiveram alguma ação contra o biofilme de *S. mutans* (KOO et al., 2003; SILVA et al., 2016; SLOBODNÍKOVÁ et al., 2016).

Os compostos fenólicos podem agir contra biofilme por diversos mecanismos. Para acontecer a adesão bacteriana, a célula, até então no estado planctônico, deve se mover em direção à superfície, seja por meio do fluxo no meio ou pela presença de pili e flagelos. O ácido

ferrúlico e o ácido gálico, por exemplo, agem reduzindo a formação do biofilme e a motilidade de espécies Gram-positivas e Gram-negativas. Dessa forma, a menor motilidade dos microrganismos pode estar relacionada a uma menor adesão bacteriana e, conseqüentemente, menor formação dessa estrutura (BORGES et al., 2012).

Algumas bactérias, principalmente as Gram-negativas, utilizam como molécula sinalizadora no *Quorum sensing* a N-acil homo-serina lactona (AHL). Essa molécula tem a função de controlar a expressão de genes responsáveis pela densidade e maturação do biofilme. Alguns polifenóis podem agir penetrando no biofilme e inibindo a sinalização da AHL, como consequência, há uma perda na densidade bacteriana dentro do biofilme e conseqüentemente a destruição da estrutura (PLYUTA et al., 2013; ROY et al., 2018).

Taninos podem agir quebrando peptideoglicanos que estão presentes na parede bacteriana. Essa quebra leva a uma alteração na composição de proteínas e ácido teicóico da parede, reduzindo a capacidade de formação do biofilme. A clivagem dos peptideoglicanos também pode fazer com que haja liberação de moléculas sinalizadoras, modulando a expressão de genes associados à produção da estrutura. Podem agir também se ligando aos peptideoglicanos e causando danos na parede celular, impedindo a adesão bacteriana e levando a alterações na biomassa e viabilidade do biofilme (HUBER et al., 2003; LUÍS et al., 2013; ROY et al., 2018).

A eficácia dos compostos fenólicos contra o biofilme pode depender de alguns fatores, como pH, concentração ou características da espécie bacteriana em questão. O estudo de Silva et al. (2016) buscou avaliar o efeito de alguns ácidos fenólicos (ácido clorogênico, ferrúlico, gálico, cafeico, cumárico, siríngico e sinápico) contra o biofilme de diversas espécies. Os autores observaram que a ação dos compostos contra o biofilme das espécies tinha direta relação com o pH. Uma variação no pH leva as moléculas ácidas a diferentes níveis de protonação e, conseqüentemente, a diferentes interações físico-químicas com os microrganismos. Por isso, a ação dos compostos fenólicos ácidos contra o biofilme pode variar.

Plyuta et al. (2013) mostraram em seu estudo que o efeito de alguns compostos fenólicos contra o biofilme de *P. aeruginosa* era dependente da concentração utilizada. Nas concentrações dos compostos onde o crescimento bacteriano não era alterado, a formação do biofilme era estimulada. Em concentrações mais altas, onde o crescimento bacteriano era reduzido, o biofilme era inibido. Os autores observaram que concentrações sub-inibitórias de alguns fenóis agiam aumentando a expressão de AHL, aumentando a densidade bacteriana e, por isso, a formação do biofilme era aumentada.

2.3.1 Utilização de compostos fenólicos em associação com antibióticos contra bactérias

Tendo o conhecimento das características e perigo da formação do biofilme pelas bactérias, o estudo dessa forma de vida e compostos capazes de eliminá-lo são de grande importância atualmente. Como mostrado acima, é possível observar que diversos compostos fenólicos possuem ação tanto antimicrobiana como contra o biofilme das principais espécies formadoras. Dessa forma, podem funcionar como alternativa para eliminação dessa forma de vida, facilitando o acesso e ação dos antimicrobianos nas infecções.

Como a busca por novos compostos com ação contra microrganismos é um processo demorado, devido à necessidade de estudos *in vitro* e *in vivo* para a utilização como medicamento, e que raramente tem sucesso, novos caminhos passaram a ser utilizados. Dessa forma, além de procurar substâncias únicas e novas que tivessem efeito contra as bactérias, vários estudos passaram a focar numa associação sinérgica entre os antibióticos já existentes ou entre antibióticos já utilizados e compostos naturais (FRIERI et al., 2016; LIM et al., 2016; DODDS, 2016; SANHUEZA et al., 2017; AZUCENA et al., 2019).

O termo sinergismo é utilizado quando o efeito de uma substância em associação com outra é mais benéfico do que o efeito da substância isolada. O mecanismo que vai ser responsável pelo efeito sinérgico depende das substâncias utilizadas e parece ser específico de cada espécie bacteriana, visto que alguns estudos mostram associações benéficas para uma espécie, mas sem efeito em outra. Algumas dessas interações já são utilizadas na clínica como, por exemplo, inibidores de β -lactamase (sulbactam, ácido clavulônico e tazobactam) em associação com amoxicilina (LANGEVELD et al., 2013; LIMA et al., 2016; AYAZ et al., 2019).

Como já foi dito, as plantas possuem metabólitos secundários com diversas propriedades benéficas, dentre elas a ação contra bactérias. Sendo assim, diversos estudos estão sendo realizados buscando a interação de compostos naturais e antibióticos como uma nova alternativa para a resistência bacteriana. Esta associação pode vir a trazer uma redução na toxicidade do medicamento, já que, com a associação, a concentração inibitória mínima (CIM) é reduzida e a concentração utilizada dos compostos pode ser reduzida (LIM et al., 2016; AYAZ et al., 2019; AZUCENA et al., 2019).

Esses compostos também podem agir tornando a bactéria mais susceptível ao antibiótico. Por exemplo, alguns compostos podem agir inibindo o sítio ativo de modificação do antibiótico na bactéria, aumentando a permeabilidade da membrana bacteriana ao antibiótico ou inibindo enzimas bacterianas capazes de degradar antibióticos (AYAZ et al., 2019).

Como foi dito, compostos fenólicos compreendem um dos grupos mais numerosos de metabólitos secundários de plantas, e muitos estudos buscam avaliar a atividade desses compostos contra bactérias. Nesse sentido, os fenóis também vêm sendo avaliados quanto ao sinergismo com antibióticos. Lima et al. (2016) mostraram que pelo menos um dos compostos fenólicos testados (ácido gálico, pirogalol e ácido caféico) em associação com antibióticos (imipenem, gentamicina e norfloxacin) teve efeito na redução da CIM em Gram-positivas e Gram-negativas. Lim et al. (2016) também mostraram em seu estudo que o extrato de folha de azeitona, rico em compostos fenólicos, em associação com o antibiótico ampicilina reduziu significativamente a CIM em *S. aureus* e *E. coli*, quando comparado com o antibiótico administrado isoladamente.

Outro composto fenólico, a curcumina, se mostrou eficaz em associação com alguns antibióticos como ceftriaxona, amoxicilina/ácido clavulônico e ciprofloxacina contra isolados de *E. coli*. Ácido p-cumárico, ácido sinático, ácido cafeico, ácido vanílico, ácido gálico e taxifolina também agiram aumentando a sensibilidade de *Campylobacter jejuni* frente a ciprofloxacina e eritromicina. Um dos mecanismos desses compostos foi através do aumento da permeabilidade dos antibióticos nas bactérias mencionadas (OH E JEON, 2015; AZUCENA et al., 2019).

Alguns estudos mostraram a eficácia na associação de compostos naturais com antibióticos contra *E. faecalis*. Nagoshi et al. (2006) mostraram que extratos de gengibre reduziram a CIM de aminoglicosídeos contra *Enterococcus* vancomicina-resistentes (VRE). Kali et al. (2016) mostraram em seu estudo que a associação da curcumina com ciprofloxacina reduziu a formação de biofilme em *E. faecalis* e outros isolados Gram-positivos. Dessa forma, a associação de compostos fenólicos com antibióticos já existentes é viável e pode contribuir como uma alternativa contra a resistência bacteriana.

3 ARTIGO I

Artigo a ser submetido à Revista Brasileira de Epidemiologia

**Avaliação da formação de biofilme e presença de genes de virulência em isolados clínicos
de *Enterococcus faecalis***

Evaluation of biofilm formation and virulence genes in clinical isolates of *Enterococcus
faecalis*

**Marília Martins Manta¹, Bárbara de Azevedo Ramos², Túlio Diego da Silva³, Maria
Tereza dos Santos Correia¹.**

¹Departamento de Bioquímica, Centro de Biociências – Universidade Federal de Pernambuco, Recife – Pernambuco, Brasil.

²Departamento de Antibióticos – Universidade Federal de Pernambuco, Recife – Pernambuco, Brasil.

³Centro de Tecnologia e Estratégias do Nordeste (CETENE), Recife – Pernambuco, Brasil.

Resumo: *Enterococcus faecalis* é uma bactéria Gram-positiva comumente encontrada no trato gastrointestinal, mas pode causar infecções graves. Muitos enterococos possuem resistência ampla a antibióticos incluindo as penicilinas, cefalosporinas, aminoglicosídeos, glicopeptídeos, entre outros. Há diversos mecanismos de adaptação que as bactérias podem sofrer para se tornar mais resistentes, dentre eles há a formação do biofilme. Vários genes vêm sendo relacionado ao aumento da capacidade de formação de biofilme pela bactéria como o *gelE*, que expressa a gelatinase, o *esp*, que expressa a proteína de superfície enterocócica e *asa1*, que expressa as substâncias de agregação. **Objetivo:** Analisar o perfil de resistência e avaliar a capacidade de formação de biofilme de 12 isolados de *E. faecalis* coletados em hospital e uma cepa padrão, assim como avaliar a hidrofobicidade de sua membrana e a presença de genes de virulência. **Métodos:** Foram utilizados 12 isolados clínicos de *E. faecalis* e uma cepa padrão (UFPEDA). Foi realizada a avaliação da formação de biofilme pelo método Cristal Violeta, a hidrofobicidade bacteriana por meio de adesão à solvente apolar e a presença dos genes de virulência por meio da Reação em Cadeia da Polimerase. **Resultados:** Foi observado a presença de cinco isolados MDR. Todos os isolados formaram biofilme e as características de sua membrana foram classificadas tanto como hidrofílicas quanto hidrofóbicas. Além disso, foi encontrada a presença de pelo menos um dos genes de virulência nos 12 isolados, e nenhum dos genes na cepa padrão. **Conclusão:** De um modo geral, os isolados clínicos de *E. faecalis* formadores de biofilme apresentaram os genes de virulência e característica da membrana distinta. Além disso, há uma estreita relação entre a formação de biofilme, aquisição de resistência à antibióticos e a presença de genes de virulência.

Palavras-chaves: Enterococos; Gelatinase; Proteína de superfície enterocócicas; Substância de agregação; Hidrofobicidade; Resistência.

Abstract: *Enterococcus faecalis* is a Gram-positive bacterium commonly found in the gastrointestinal tract but can cause serious infections. Many enterococci have broad resistance to antibiotics including penicillins, cephalosporins, aminoglycosides, glycopeptides, among others. There are several adaptation mechanisms that bacteria can undergo to become more resistant, among them is the formation of biofilm. Several genes have been related to the increase in the capacity of biofilm formation by bacteria such as *gelE*, which expresses gelatinase, *esp*, which expresses enterococcal surface protein and *asa1*, which expresses aggregation substances. **Objective:** Analyze the resistance profile and evaluate the biofilm formation capacity of 12 isolates of *E. faecalis* collected in hospital and a standard strain, as well as assess the hydrophobicity of its membrane and the presence of virulence genes. **Methods:** Twelve clinical isolates of *E. faecalis* and one standard strain (UFPEDA) were used. Biofilm formation was evaluated using the Violet Crystal method, bacterial hydrophobicity through adhesion to the nonpolar solvent and the presence of virulence genes through the Polymerase Chain Reaction. **Results:** The presence of five MDR isolates was observed. All isolates formed biofilm and the characteristics of their membrane were classified as both hydrophilic and hydrophobic. In addition, the presence of at least one of the virulence genes was found in the 12 isolates, and none of the genes in the standard strain. **Conclusion:** In general, the biofilm-forming *E. faecalis* clinical isolates presented the virulence and distinct membrane characteristic genes. In addition, there is a close relationship between biofilm formation, acquisition of antibiotic resistance and the presence of virulence genes. **Keywords:** Enterococci; Gelatinase; Enterococcal surface protein; Aggregating substance; Hydrophobicity; Resistance.

3.1 INTRODUÇÃO

Enterococcus faecalis é uma bactéria Gram-positiva, anaeróbia facultativa e que se apresenta em cocos sozinho ou aos pares. É um comensal saprofítico que habita a cavidade oral e gastrointestinal de humanos. São patógenos oportunistas e geralmente causam infecções severas, onde é responsável por cerca de 12% das infecções nosocomiais ^{1,2}.

É a espécie predominante do gênero *Enterococcus*, onde cerca de 85% das infecções enterocócicas são causadas por *E. faecalis*. Além disso, a presença de resistência intrínseca e adquirida desse micro-organismo atribui a ele a capacidade de ser resistente a diversos antimicrobianos utilizados na clínica, dificultando o tratamento de suas infecções ^{3,4,5}.

Existem diversos mecanismos de adaptação que os micro-organismos podem sofrer para resistirem ao meio em que vivem, o que pode torná-las ainda mais resistentes e virulentas. Um deles é a capacidade de formação de biofilme, que ocorre quando bactérias planctônicas se aderem irreversivelmente a um substrato e passam a produzir material exopolimérico ⁶. Segundo Mohamed e Huang ⁷, as bactérias que estão presentes no biofilme conseguem sobreviver a concentrações até 1000 vezes maiores de antibióticos, mostrando a importância e o perigo da formação dessa estrutura nas infecções.

Alguns estudos mostram a relação da presença de genes, como *gelE*, *esp* e *asa1* com a capacidade da bactéria formar biofilme, aumentando tanto a resistência bacteriana aos antimicrobianos como também a virulência deste micro-organismo ^{8,9,10,11}. Além da presença de genes, há estudos que relatam a hidrofobicidade celular das bactérias como sendo um fator de virulência, relacionando-a à capacidade do micro-organismo em aderir à um substrato e formar biofilme ^{12,13}. Dessa forma, este artigo busca avaliar a capacidade de formar biofilme, a hidrofobicidade celular e a presença de genes de virulência de isolados clínicos de *E. faecalis*.

3.2 MÉTODOS

3.2.1 Cepas bacterianas e condições de crescimento

Foram utilizados 12 isolados clínicos de *E. faecalis* coletados em um hospital da cidade do Recife (Pernambuco) e uma cepa padrão (UFPEDA 09) cedida da Coleção do Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE). A pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética da UFPE (n° 2.581.568 / CAAE: 84015517.7.0000.5208). Os isolados clínicos foram coletados de diferentes sítios de infecção (Tabela 1). As culturas foram crescidas em ágar infusão de cérebro e coração (BHI) a 37 °C por 24 h e armazenadas em caldo infusão de cérebro e coração e 15% de glicerol a 20 °C negativos.

3.2.2 Confirmação da identidade celular por MALDI-TOF

A espécie dos isolados foi confirmada pela técnica de MALDI-TOF. Os isolados foram desativados e obtidos a fração proteica para aplicação na placa do MALDI. A matriz celular foi preparada com ácido alfa-ciano-4-hidroxicinâmico (10 mg/mL) em acetonitrila 50% e ácido trifluoroacético 0,3% e aplicada na placa de MALDI com a amostra em temperatura ambiente para cristalização. A aquisição dos espectros de MS em modo linear positivo (Voltagem de aceleração: 20 kV e Faixa de detecção - m/z: 2.000 – 20.000) foi realizada pelo Programa Flex Control Version 3.0 em Espectrômetro de Massa MALDI-TOF Autoflex III (Bruker Daltonics, Billerica, MA, USA). Os espectros obtidos foram comparados com o Banco de Dados MALDI Biotyper Version 3.1 e foi dado um score de compatibilidade variando de 0.000-1.699 (identificação não confiável), 1.700-1.999 (provável identificação de gênero), 2.000-2.299 (identificação segura de gênero e provável identificação de espécie) e 2.300-3.00 (identificação de espécie altamente provável).

3.2.3 Avaliação da formação de biofilme

A formação de biofilme pelos isolados de *E. faecalis* foi avaliada em placas de microtitulação, pelo método de Cristal Violeta descrito por Stepanovic et al. ¹⁴ em meio de cultura BHI e placa de poliestireno. A partir das leituras de densidade óptica (DO), foi determinada a média dos valores da absorbância de cada amostra (DOa) em comparação com a absorbância do controle de esterilidade (DOc). As amostras foram classificadas como fortemente ($4x DOc < DOa$), moderadamente ($2x DOc < DOa \leq 4x DOc$) e fracamente ($DOc < DOa \leq 2x DOc$) formadoras de biofilme. Os isolados que apresentaram valores de absorbância igual ou inferior ao controle foram classificados como não produtores de biofilme.

3.2.4 Determinação da hidrofobicidade bacteriana

A hidrofobicidade dos isolados de *E. faecalis* foi avaliada pelo ensaio de adesão microbiana a solvente, proposto por Tendolkar ¹⁵, que consiste na afinidade microbiana a um solvente apolar (ρ -xileno). As células bacterianas foram crescidas 24 horas em meio BHI líquido a 37 °C. Posteriormente foi feita uma diluição 1:50 em BHI e foi incubada novamente por 4 horas. Após, foram centrifugadas a 5000 rpm por 5 minutos e ressuspensas em tampão PUM (pH 7,1) ajustando a absorbância para 1,000 ($\sim 10^8$ UFC mL⁻¹, DO₄₀₀). Foi retirado 1mL da suspensão e adicionado a 250 μ L de ρ -xileno e incubado por 10 min a 30 °C. Posteriormente foi agitado durante 120 segundos e deixada em repouso por 30 minutos para separação das fases. Foi retirado 200 μ L da fase aquosa e feito a leitura a 400 nm. O teste foi feito em triplicata. A porcentagem de adesão microbiana ao solvente hidrofóbico (AMSH) é expressa pela seguinte fórmula: $AMSH = [1 - (Abs2/Abs1) \times 100]$.

3.2.5 Detecção dos genes de virulência

O DNA genômico dos isolados foi extraído por meio do kit comercial GenElute Bacterial Genomic DNA (Sigma-Aldrich, EUA), quantificados e armazenada a -20 °C. Os genes de virulência *gelE* (F: CGAAGTTGGAAAAGGAGGC; R: GGTGAAGAAGTTACTCTGA), *esp* (F: AGATTTTCATCTTTGATTCTTGG; R: AATTGATTCTTTAGCATCTGG) e *asa1* (F: AAGAAAAGAAGTAGACCAAC; R: AAACGGCAAGACAAGTAAATA) foram identificados por PCR de acordo com instruções do kit SuperMix (Invitrogen). As condições da PCR foram: desnaturação inicial a 94 °C por 2 min, 35 ciclos de: 94 °C por 30s, 56 °C por 30s e 72 °C por 1min, com uma extensão final de 72 °C por 5 min, seguido por um resfriamento de 4 °C. Os amplicons foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1,2% e tampão Tris-borato EDTA (TBE) 0,5X e visualizado por SYBR® Green no fotodocumentador. As amostras foram consideradas positivas comparados com um controle positivo (Cepa 19185 depositado no GenBank como MN508951, MN508952, MN508953).

3.3 RESULTADOS

Os resultados estão apresentados na Tabela 1, onde os isolados e a cepa de coleção estão identificadas, assim como suas origens. Os scores obtidos pelo MALDI confirmaram a identidade celular das cepas de *E. faecalis*, com pontuações variado de 2.262 a 2.525.

Os isolados foram obtidos da clínica médica, Unidades de Tratamento Intensivo (UTIs), ambulatório, ortopedia e leito vascular. Além disso, nove das 12 amostras foram coletadas a partir de urina. Também foi analisado o perfil de resistência dos isolados, podendo observar que todas as cepas hospitalares já possuíam resistência a algum antibiótico utilizado em clínica, como ciprofloxacina, eritromicina, gentamicina ou moxifloxacina. Cinco das 12 cepas foram classificadas como multidroga resistentes (MDR).

Tabela 1: Resultados obtidos nas análises das cepas testadas

ID	MALDI (score)	Origem	Local de isolamento	Perfil de resistência	Classificação	Hidrofobicidade	Formação de biofilme (BHI)	Genes de virulência		
								<i>gelE</i>	<i>esp</i>	<i>asa1</i>
09	2.278	UFPEDA	Coleção	Sensível a todos antibióticos		M HFB	+++	-	-	-
135.4	2.463	Urina	Clínica médica	CIP – ERI – EST – GEN – MOX - NOR	MDR	HFB	+++	+	+	+
729.4	2.458	Urina	Clínica médica	ERI – EST		M HFB	+++	+	+	-
958.3	2.510	Urina	Ambulatório	ERI		HFL	+++	-	-	-
961.3	2.411	Sangue	Clínica médica	AMP – CIP – ERI – GEN – MOX – NOR – TEI – VAN	MDR	HFL	+++	-	-	+
34.4	2.525	Ferida operatória	Ortopedia	CIP – ERI – EST – MOX - NOR	MDR	HFB	+++	-	-	+
563.4	2.468	Urina	Leito vascular	ERI		M HFB	+++	-	+	+
253.4	2.481	Urina	UTI	ERI – EST		HFL	+++	+	+	-
111.7	2.262	Urina	Clínica médica	CIP – ERI – EST – GEN – MOX – NOR	MDR	HFL	+++	-	+	+
797.6	2.290	Líquido peritoneal	Leito vascular	CIP – ERI – EST – MOX		HFB	+++	+	+	+
946.6	2.371	Urina	Ambulatório	GEN		HFB	++	-	+	+
879.6	2.446	Urina	UTI	ERI – EST		M HFB	+++	-	+	-
794.6	2.501	Urina	Clínica médica	ASB – ATM – CAZ – CFO – CFZ – CRO – CRX – TIC - TOB	MDR	HFB	+++	-	-	+

MDR – resistente a mais de um agente antimicrobiano; CIP – Ciprofloxacina; ERI – Eritromicina; EST - Estreptomicina; GEN – Gentamicina; MOX - Moxifloxacina; NOR - Norfloxacin; AMP – Ampicilina; TEI - Teicoplanina; VAN – Vancomicina; ASB – Ampicilina + Sulbactam; ATM - Aztreonam; CAZ - Ceftazidima; CFO - Cefoxitina; CFZ - Cefazolina; CRO - Ceftriaxona; CRX - Cefuroxima; TIC - Ticarcilin; TOB - Tobramicina; HFB – Hidrofóbico; M HFB – Moderadamente hidrofóbico; HFL – Hidrofilico

Quanto à capacidade de formação de biofilme, observa-se que todas as cepas formam biofilme, sendo 12 delas fortes formadoras de biofilme e uma forma moderadamente. Já quanto à hidrofobicidade, cinco foram classificadas como hidrofóbicas, quatro como moderadamente hidrofóbicas e quatro como hidrofílicas.

Dos genes de virulência associados ao biofilme testados, observa-se na Tabela 1 que quatro dos isolados possuem o gene *gelE* e oito possuem o gene *esp* e *asa1*, indicando a presença desses genes nas cepas hospitalares. Um dos isolados possui os 3 genes e foi classificado como hidrofóbico (797.6) e apenas um isolado não possui nenhum dos genes, e foi classificado como hidrofílico (958.6).

3.4 DISCUSSÃO

A maior prevalência dos isolados encontrados a partir de amostras de urina ocorre pelo fato da preferência da espécie pelo sistema urinário. Infecções do trato urinário estão entre as mais comuns nos humanos, e estudos mostram que *E. faecalis* possui grande capacidade de invadir, colonizar e causar infecções nesse sistema^{16,17}.

Das cinco cepas classificadas como MDR todas foram fortes formadoras de biofilme e três delas foram coletadas a partir da urina. Estudos anteriores já tinham reportado a presença de *E. faecalis* resistente aos diversos antimicrobianos utilizados na clínica. Inclusive reportando a incidência de cepas multirresistentes (MDR), o que torna cada vez mais difícil o tratamento das infecções causadas por esse patógeno^{18, 19, 20}. A maioria dos *Enterococcus* classificados como MDR são de linhagens hospitalares, indicando uma presença cada vez maior desses organismos resistentes nesse ambiente. Além disso, o gênero *Enterococcus* possui a habilidade de transmitir resistência à diversos outros gêneros, incluindo Gram-positivas e Gram-negativas, o que torna preocupante a presença desses microrganismos nos ambientes hospitalares^{21, 22}.

Os resultados indicam que os isolados testados de *E. faecalis* possuem alta capacidade em formar biofilmes, corroborando com estudos de Hashem et al.²³ e Zheng et al.¹⁰. Buscou-se uma relação para a alta capacidade de formação de biofilme dos isolados, seja por meio da avaliação da hidrofobicidade ou pela presença de genes de virulência. Como pôde ser visto, tanto cepas hidrofílicas quanto hidrofóbicas apresentaram forte formação de biofilme. Dessa forma, não houve relação entre as características da membrana das cepas com a formação do biofilme em diferentes superfícies.

Quanto aos genes de virulência nos isolados MDR, *gelE* estava presente em uma das cepas, *esp* em duas e *asa1* estava presente em todos. O gene *gelE* codifica a gelatinase, que é responsável pela hidrólise de colágeno, caseína e hemoglobina. O gene *esp* codifica a proteína de superfície de enterococos, e sua presença está relacionada com um aumento da colonização e persistência da bactéria no trato urinário. Já o gene *asa1* codifica a substância agregadora, que facilita a conjugação bacteriana. De modo geral, a presença desses genes está relacionada com uma maior virulência bacteriana^{9, 24, 25}.

Com os resultados do presente estudo, observa-se a ausência dos genes na cepa padrão e a presença dos genes em 11/12 dos isolados, indicando a alta prevalência deles em cepas infecciosas hospitalares. Porém, com os resultados obtidos não é possível identificar uma relação entre o genótipo e o fenótipo dos isolados. Segundo Tendolkar et al.²⁴, a formação de biofilme sofre a influência de diversos fatores como a superfície aderente, interações moleculares das bactérias e produção de proteínas. A formação do biofilme funciona, então, como um processo multifatorial, onde diversas características atuam juntas influenciando na sua estrutura e formação¹⁵.

Em conclusão, é possível afirmar a capacidade de isolados de *Enterococcus faecalis* formar fortemente biofilme, a presença de genes de virulência nesses isolados e a incidência de *E. faecalis* MDR em hospitais, tornando a infecção mais agressiva e de difícil tratamento. Mais

estudos devem ser feitos buscando o aprofundamento no mecanismo multifatorial da formação do biofilme, sendo possível entendê-lo melhor e buscar soluções para inibição da estrutura.

3.5 REFERÊNCIAS

1. FISHER, K, PHILLIPS, C. The ecology, epidemiology and virulence of *Enterococcus*. *Microbiology*, v. 155(6), p. 1749-1757, 2009.
2. CAMPOS, ACFB, SOUZA, NR, SILVA, PHC, SANTANA, AP. Resistência antimicrobiana em *Enterococcus faecalis* e *Enterococcus faecium* isolados em carcaça de frango. *Pesq. Vet. Bras.* 2013; 33:5, 575-580.
3. BOYNUKARA, B, EKIN, IH, AKSAKAL, A, GÜLHAN, T. Isolation and antibiotic susceptibility of enterococci from human, dog and cat faeces. *Vet Mikrobiyol Derg* 2002; 3, 37-42.
4. MERLO, TP. Comparação genotípica e fenotípica de *Enterococcus faecalis* resistentes à vancomicina isolados nos anos 2009 e 2011 em um hospital de Minas Gerais [Mater's thesis]. São Carlos: Instituto de Física de São Carlos da Universidade de São Paulo (USP); 2013.
5. CECI, M, DELPECH, G, SPARO, M, MEZZINA, V, BRUNI, SS, BALDACCINI, B. Clinical and microbiological features of bacteremia caused by *Enterococcus faecalis*. *The Journal of Infection in Developing Countries* 2015, 9:11, 1195-1203, 2015.
6. STOODLEY, P, CARGO, R, RUPP, CJ, WILSON, S, KLAPPER, I. Biofilm material properties as related to shear-induced deformation and detachment phenomena. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* 2002; 29, 361-367.
7. MOHAMED, JA, HUANG, DB. Biofilm formation by enterococci. *Journal of Medical Microbiology* 2007; 56, 1581-1588.

8. IGBNOSA, EO, BESHIRU, A. Antimicrobial resistance, virulence determinants, and biofilm formation of *Enterococcus* species from ready-to-eat seafood. *Frontiers in microbiology* 2019; 10, 728.
9. SOARES, RO, FEDI, AC, REITER, KC, CAIERÃO, J, d'AZEVEDO, PA. Correlation between biofilm formation and *gelE*, *esp* and *agg* genes in *Enterococcus* spp. clinical isolates. *Virulence* 2014; 5:5, 634-637.
10. ZHENG, J, WU, Y, LIN, Z, PU, Z, YAO, W, CHEN, Z, LI, D, DENG, Q, QU, D, Y, Z. Characteristics of and virulence factors associated with biofilm formation in clinical *Enterococcus faecalis* isolates in China. *Frontiers in Microbiology* 2017; 8:2338. <http://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02338>
11. AGHDAM, MA, BARHAGHI, MHS, AGHAZADEH, M, JAFARI, F, HAGH, MB, HAGHDOOST, M, MEMAR, MY, REZAEI, AM, KAFIL, HS. Virulence genes in biofilm producer *Enterococcus faecalis* isolates from root canal infections. *Cellular and molecular biology* 2017; 63(5):55-59.
12. DABIRI, S, SHAMS-GHAHFAROKHI, M, RAZZAGHI-ABYANEH, M. Comparative analysis of proteinase, phospholipase, hydrophobicity and biofilm forming ability in *Candida* species isolated from clinical specimens. *Journal De Mycologie Médicale* 2018; 28:3, 437-442.
13. MIRANI, ZA, FATIMA, A, UROOJ, S, AZIZ, M, KHAN, MN, ABBAS, T. Relationship of cell surface hydrophobicity with biofilm formation and growth rate: A study on *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, and *Escherichia coli*. *Iranian J Basic Med Sci* 2018; 21, 760-769.
14. STEPANOVIC, S, VUKOVIC, D, HOLA, V, BONAVENTURA, GD, DJUKIC, S, CIRKOVIC, I, RUZICKA, F. Quantification of biofilm in microtiter plates: overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by *Staphylococci*. *APMIS* 2007; 115:8, 891-899.

15. TENDOLKAR, PM, BAGHDAYAN, AS, GILMORE, MS, SHANKAR, N. Enterococcal surface protein, Esp, enhances biofilm formation by *Enterococcus faecalis*. *Infection and Immunity* 2004; 72:10, 6032-6039.
16. SENO, Y, KARIYAMA, R, MITSUHATA, R, MONDEN, K, KUMON, H. Clinical implications of biofilm formation by *Enterococcus faecalis* in the urinary tract. *Okayama University Medical School* 2005; 59:3, 79-87.
17. TIEN, BYQ, GOH, HMS, CHONG, KKL, BHADURI-TAGORE, S, HOLEC, S, DRESS, R, GINHOUX, F, INGERSOLL, MA, WILLIAMS, RBH, KLINE, KA. *Enterococcus faecalis* promotes innate immune suppression and polymicrobial catheter-associated urinary tract infection. *Infection and immunity* 2017; 85:12.
18. ARIAS, CA, CONTRERAS, GA, MURRAY, BE. Management of multidrug-resistant enterococcal infections. *Clinical Microbiology and Infection* 2010; 16:6, 555-562.
19. WANG, J, CHANG, S, WANG, H, CHEN, P, SHIAU, Y, LAUDERDALE, T. High rates of multidrug resistance in *Enterococcus faecalis* and *E. faecium* isolated from inpatients and outpatients in Taiwan. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 2013; 75, 406-411.
20. JAHANSEPAS, A, AGHAZADEH, M, REZAEI, MA, HASANI, A, SHARIFI, Y, AGHAZADEH, T, MARDENEH, J. Occurrence of *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* in various clinical infections: detection of their drug resistance and virulence determinants. *Microbial drug resistance* 2018; 24:1, 76-82.
21. WU, X, HOU, S, ZHANG, Q, MA, Y, ZHANG, Y, KAN, W, ZHAO, X. Prevalence of virulence and resistance to antibiotics in pathogenic enterococci isolated from mastitic cows. *Bacteriology* 2016; 78:11, 1663-1668.
22. LEBRETON, F, MANSON, AL, SAAVEDRA, JT, STRAUB, TJ, EARL, AM, GILMORE, MS. Tracing the Enterococci from Paleozoic Origins to the Hospital. *Cell* 2017; 169,849-861.

23. HASHEM, YA, AMIN, HM, ESSAM, TM, YASSIN, AS, AZIZ, RK. Biofilm formation in enterococci: genotype-phenotype correlations and inhibition by vancomycin. *Scientific Reports* 2017; 7. <http://doi.org/10.1038/s41598-017-05901-0>
24. TENDOLKAR, PM, BAGHDAYAN, AS, GILMORE, MS, SHANKAR, N. Enterococcal surface protein, Esp, enhances biofilm formation by *Enterococcus faecalis*. *American Society for Microbiology* 2004. <http://doi.org/10.1128/IAI.72.10.6032-6039.2004>.
25. KIRUTHIGA, A, PADMAVATHY, K, SHABANA, P, NAVEENKUMAR, V, GNANADESIKAN, S, MALAIYAN, J. Improved detection of *esp*, *hyl*, *asa1*, *gelE*, *cylA* virulence genes among clinical isolates of Enterococci. *BMC Res Notes* 2020; 13:170.

4 ARTIGO II

Artigo a ser submetido à Revista “Research in Microbiology”

**Associação de antibióticos com rutina e quercetina no crescimento e formação do
biofilme de isolados clínicos de *Enterococcus faecalis***

Marília Manta^a, Bárbara Ramos^b, Túlio da Silva^c, Maria Tereza Correia^{a*}

^aDepartamento de Bioquímica, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Brasil. Avenida Professor Moraes Rego, 1235. CEP: 50670-901

^bDepartamento de Antibióticos, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Brasil. Avenida Professor Moraes Rego, 1235. CEP: 50670-901

^cCentro Analítica, CETENE (Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste), Recife, Brasil. Avenida Professor Luis Freire, 1. CEP: 50740-545

Resumo: *Enterococcus faecalis* é uma bactéria oportunista que pode causar infecções severas. A resistência em *E. faecalis* vem aumentando, e as infecções causadas por este micro-organismo vem se tornando cada vez mais difíceis de tratar. A associação de antibióticos com outros compostos vêm sendo uma alternativa para esse problema. Quercetina e rutina são compostos fenólicos que possuem atividade antimicrobiana contra diversas espécies. Gentamicina e ciprofloxacina são antibióticos de classes distintas, utilizados já como uma alternativa para infecções por *E. faecalis* resistentes aos antibióticos de primeira linha, mas já foi relatada a resistência desta espécie a estes fármacos. Dessa forma, este trabalho buscou avaliar a associação de rutina e quercetina com ciprofloxacina e gentamicina no crescimento e formação de biofilme de *E. faecalis*. Quercetina em associação com os dois antibióticos inibiu o crescimento bacteriano dos isolados testados, enquanto a rutina com os dois antibióticos agiu aumentando o crescimento bacteriano. Em contraste, a associação dos antibióticos com rutina foi melhor do que com a quercetina, inibindo a formação de biofilme em dois isolados. Esses dois compostos influenciam mecanismos distintos na bactéria, tornando-a mais sensível à ação do medicamento.

Palavras-chaves: Sinergismo; Compostos fenólicos; Gentamicina; Ciprofloxacina; Resistência.

Abstract: *Enterococcus faecalis* is a bacterium present in the microbiota but is opportunistic and can cause severe infections. The resistance in *E. faecalis* has been increasing, and the infections caused by this microorganism are becoming even more difficult to treat. The association of antibiotics with other compounds has been an alternative to this problem. Quercetin and rutin are phenolic compounds that have antimicrobial activity against several species. Gentamycin and ciprofloxacin are antibiotics of different classes, used as an alternative for infections by *E. faecalis* resistant to first line antibiotics, but resistance of this species to these drugs has already been reported. Thus, this work sought to evaluate effects of the association of rutin or quercetin with ciprofloxacin or gentamycin on growth and formation of *E. faecalis* biofilm. Quercetin in combination with the two antibiotics inhibited the bacterial growth of the isolates, while the rutin with the two antibiotics acted increasing bacterial growth. In contrast, the association of antibiotics with rutin was better than quercetin, inhibiting biofilm formation in two isolates. These two compounds influence different mechanisms of the bacterium, making it more sensitive to the action of the drug.

Keywords: Synergism; Phenolic compound; Gentamycin; Ciprofloxacin; Antibiotic resistance.

4.1 INTRODUÇÃO:

Nos últimos anos vem crescendo o número de espécies bacterianas com algum mecanismo de resistência aos antibióticos, que são o principal tratamento para infecções [1, 2]. Dentre as espécies que já adquiriram resistência à diversos compostos há *Enterococcus faecalis*, uma bactéria Gram-positiva presente principalmente no trato gastrointestinal de humanos, mas que é oportunista e pode vir a causar infecções severas [3]. O gênero *Enterococcus* possui resistência intrínseca a β -lactâmicos e a níveis mais baixos de aminoglicosídeos e clindamicina, assim como já foi reportada resistência adquirida a glicopeptídeos (principalmente à vancomicina), macrolídeos, tetraciclina e cloranfenicol. Somado a isso, nas últimas duas décadas vem sendo preocupante o surgimento de *Enterococcus* MDR (multidroga resistente) [4-6].

Há diversos mecanismos de adaptação que a bactéria pode sofrer para se tornar resistente e virulenta, e um deles é a formação de biofilme. De acordo com o “Natural Institutes of Health” aproximadamente 80% das infecções do mundo estão associadas a biofilmes, constituindo infecções crônicas e persistentes nos pacientes hospitalares [7, 8].

Biofilme corresponde a um agregado de micro-organismos aderidos a uma superfície e envoltos por uma matriz extracelular polimérica produzida pelos mesmos. Dessa forma, as células presentes nessa estrutura estão menos acessíveis aos antibióticos e a infecção é agravada [9, 10].

Durante o período conhecido como “era de ouro” dos antibióticos, se descobriu compostos novos de diversas classes, e muitos deles ainda são utilizados até hoje [11]. Desde o fim dessa era, vem havido uma corrida para criação de um novo antibiótico, porém, sem sucesso, e os microrganismos se tornavam cada vez mais resistente. Nos últimos anos vários estudos foram realizados visando novas alternativas contra bactérias [12, 13].

Uma das alternativas promissoras é a associação sinérgica entre compostos naturais com os antibióticos já existentes. Diversos compostos já se mostraram eficazes contra bactérias, agindo em mecanismos distintos. Dentre eles, os compostos fenólicos, que vêm se mostrando eficazes na inibição do crescimento, de toxinas, enzimas e da formação de biofilme de espécies bacterianas, inclusive Gram-positivas [14, 15].

Estudos mostraram que alguns compostos fenólicos como, por exemplo, quercetina, ácido gálico, rutina e luteolina, em sinergismo com antibióticos de diversas classes, foram eficazes contra o crescimento de *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* e *Enterococcus* spp. [16-18]. Sabendo disso, este artigo busca avaliar o efeito da quercetina e rutina, dois compostos fenólicos, em associação com ciprofloxacina e gentamicina contra o crescimento e o biofilme de *E. faecalis*.

4.2 MATERIAIS E MÉTODOS:

4.2.1 Cepas bacterianas e condições de crescimento

Foram coletados 3 isolados clínicos de *Enterococcus faecalis* MDR em hospitais público do Recife (Pernambuco, Brasil) e uma cepa padrão (UFPEDA 09) cedida da Coleção do Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco (Comitê de ética: n° 2.581.568/CAAE: 84015517.7.0000.5208). Todas as quatro cepas já tinham sido previamente classificadas como formadoras de biofilme. As culturas foram crescidas em meio ágar infusão de cérebro e coração (BHI) a 37 °C por 24h e armazenadas em glicerol (15%) a 20 °C negativos.

4.2.2 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM)

A avaliação antimicrobiana foi realizada em modelo experimental de microdiluição em série, conforme descrito anteriormente [19]. Os compostos fenólicos foram diluídos em DMSO (concentração final de 5%), nas concentrações 1000; 500; 250; 125; 62,5 µg/mL. Os

antibióticos foram diluídos em água MilliQ, nas concentrações 100; 50; 25; 12,5; 6,25 µg/mL. A suspensão bacteriana foi de $1,5 \times 10^8$ UFC/mL, ajustada com solução salina a 0,9% (DO₆₀₀ nm). Para o controle de crescimento bacteriano os compostos foram substituídos por água destilada e para o controle de esterilidade do experimento o inóculo e os compostos foram substituídos por água destilada. As placas foram incubadas a 37 °C durante 18 h. A determinação da absorbância das microplacas de 96 poços foi realizada a 625 nm, 0h e 18h.

4.2.3 Associação de compostos no crescimento e biofilme bacteriano

Para avaliar a associação dos compostos fenólicos com os antibióticos, foi utilizada a concentração de 1000 µg/mL de quercetina e rutina e os antibióticos diluídos em água MilliQ, nas concentrações 100; 50; 25; 12,5; 6,25 µg/mL. A suspensão bacteriana foi de $1,5 \times 10^8$ UFC/mL, ajustada com solução salina a 0,9% (DO₆₀₀ nm). Foi adicionado 10 µL do composto, 10 µL do antibiótico diluído, 20 µL da suspensão bacteriana e 160 µL do meio BHI. No controle de esterilidade em vez do inóculo bacteriano foi colocado água destilada e no controle de crescimento os compostos e antibióticos foram substituídos por 20 µL de água destilada. As placas foram incubadas a 37 °C durante 18 h. Para avaliação da associação no crescimento bacteriano, a determinação da absorbância das microplacas de 96 poços foi realizada a 625 nm, 0h e 18h. Para a avaliação da associação na formação de biofilme, após 24h o biofilme foi avaliado pelo método Cristal Violeta e foi avaliado a DO, comparando-se com o controle de crescimento.

4.2.4 Análise estatística

Todos os testes foram executados em triplicada e repetidos independentemente, e calculados a média e o desvio padrão. Os gráficos foram feitos no programa *GraphPad Prism* 6.0.

4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO:

4.3.1 Determinação da CIM

A CIM dos antibióticos e dos compostos fenólicos não foi encontrado nos isolados até a concentração de 100 µg/mL e 1000 µg/mL, respectivamente. A maior inibição do crescimento bacteriano nas concentrações testadas da ciprofloxacina e gentamicina se deu na concentração de 100 µg/mL, mas esta inibição não passou de 86,23% ± 1,1 (Tabela 1).

Tabela 1: Crescimento bacteriano (%) dos isolados com ciprofloxacina e gentamicina a 100 µg/mL.

	Ciprofloxacina (100µg/mL)	Gentamicina (100µg/mL)
UFPEDA	14,7 ± 1,7	82,1 ± 4,1
961.3	43,4 ± 0,4	52 ± 4,8
135.4	43,5 ± 3,4	44,7 ± 1,7
111.7	13,8 ± 1,1	65,8 ± 1,7

Enterococos têm obtido sucesso e rapidamente vêm se adaptando e adquirindo resistência aos agentes clínicos, e o aparecimento de cepas MDR vem sendo cada vez mais frequente. Gentamicina e ciprofloxacina são fármacos utilizados já como alternativa de tratamento para infecções enterocócicas, quando outros medicamentos se mostram sem efetividade [6, 21]. O mecanismo de ação da gentamicina é por meio da inibição da síntese proteica. *E. faecalis* possui resistência intrínseca às baixas concentrações de gentamicina (≤ 128 mg/L), e por isso este antibiótico é utilizado em associação para tratamento de infecções enterocócicas. Já foi relatado a incidência de resistência adquirida, em doses mais altas (> 128 mg/L) [22, 23].

Ciprofloxacina é da classe das quinolonas, sendo utilizada exclusivamente para tratar infecção urinária por *Enterococcus* spp., e sua ação se dá por interferência na replicação do DNA. Já há a aquisição de resistência por *E. faecalis*, apresentando um CIM ≥ 4 mg/L a este medicamento [21, 23].

4.3.2 Associação de compostos contra o crescimento bacteriano

Como não foi encontrado o CIM dos antibióticos e dos compostos fenólicos, foi testada a associação da rutina e quercetina na concentração de 1000 µg/mL, com ciprofloxacina e gentamicina em diluições de 100 a 6,25 µg/mL. Os resultados indicam que, de um modo geral, o crescimento bacteriano foi menor na associação dos compostos fenólicos com o antibiótico a 100 µg/mL (Tabela 2).

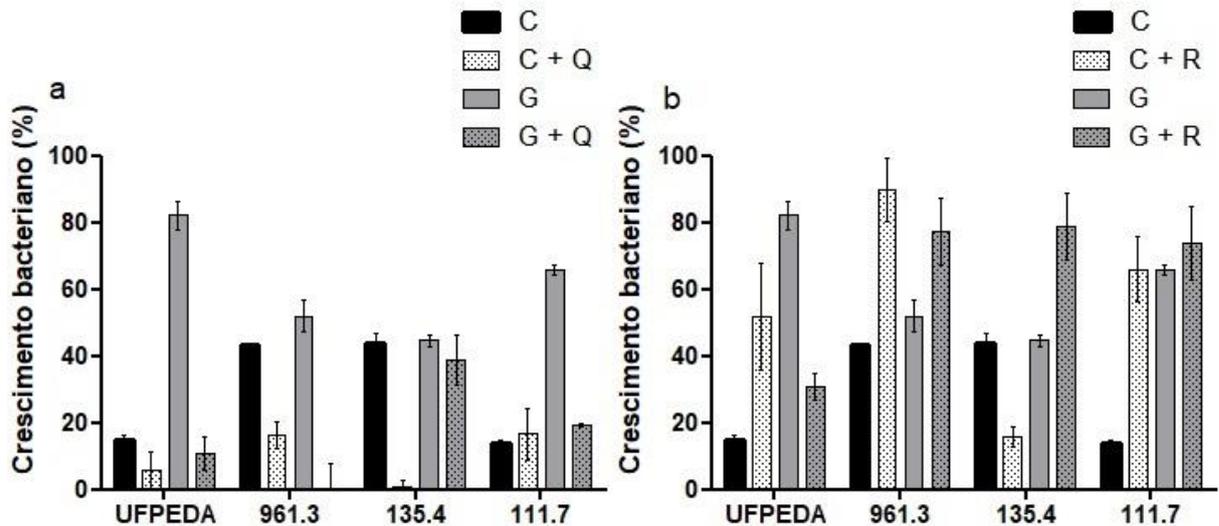
O crescimento bacteriano foi consideravelmente reduzido na associação da quercetina com a gentamicina a 100 µg/mL em todos os isolados, quando comparado com a gentamicina sozinha (Gráfico 1a). Esta associação já se mostrou eficiente na redução do CIM em *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* [24] e *Pseudomonas aeruginosa* [25]. A associação da quercetina com a ciprofloxacina a 100 µg/mL foi mais eficiente em três dos isolados, com menor crescimento bacteriano quando comparado com a ciprofloxacina sozinha na mesma concentração (Gráfico 1a). Essa associação não foi efetiva contra o crescimento de *S. aureus* [26] e *E. coli* [27]. Até o momento, não há resultado sobre essas associações com a quercetina no crescimento de *Enterococcus* spp..

Wang et al. [28] e Qu et al. [27] mostraram que a quercetina danificou a estrutura da parede celular e alterou a integridade da membrana celular de *E. coli* e *S. aureus*, permitindo o extravasamento de seus conteúdos citoplasmáticos. Este mecanismo de ação da quercetina aumenta o acesso do antibiótico à bactéria e ao seu sítio de ação, facilitando a ação do medicamento.

A rutina em associação com ciprofloxacina e gentamicina aumentou consideravelmente o crescimento bacteriano em três dos isolados, ao contrário da quercetina (Gráfico 1b). Murad et al. [29] e Jayaraman et al. [30] mostraram que a rutina em associação com ciprofloxacina não reduziu o crescimento bacteriano de *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*, respectivamente. Araruna et al. [31] mostraram que a associação rutina-gentamicina não foi

efetiva contra *S. aureus* e *E. coli*. Até o momento, não foi encontrado resultado das associações com a rutina e esses dois antibióticos contra *E. faecalis*.

Gráfico 1: Crescimento bacteriano (%) dos antibióticos isolados (100 µg/mL) e (a) associação da quercetina (1000 µg/mL) com os antibióticos (100 µg/mL); (b) associação da rutina (1000 µg/mL) com os antibióticos (100 µg/mL).



4.3.3 Associação de compostos contra a formação de biofilme

Somado à resistência aos antibióticos, *E. faecalis* possui forte capacidade de formar biofilmes, dificultando mais ainda o tratamento de suas infecções. Dessa forma, este estudo buscou avaliar se a associação de compostos serviria para diminuir a formação de biofilme por esta espécie. Para isso, também foi utilizada a concentração de 1000 µg/mL dos compostos fenólicos e diluições variando de 100 a 6,25 µg/mL de ciprofloxacina e gentamicina. Assim como no crescimento bacteriano, a melhor inibição do biofilme bacteriano se deu na concentração de 100 µg/mL (Tabela 3).

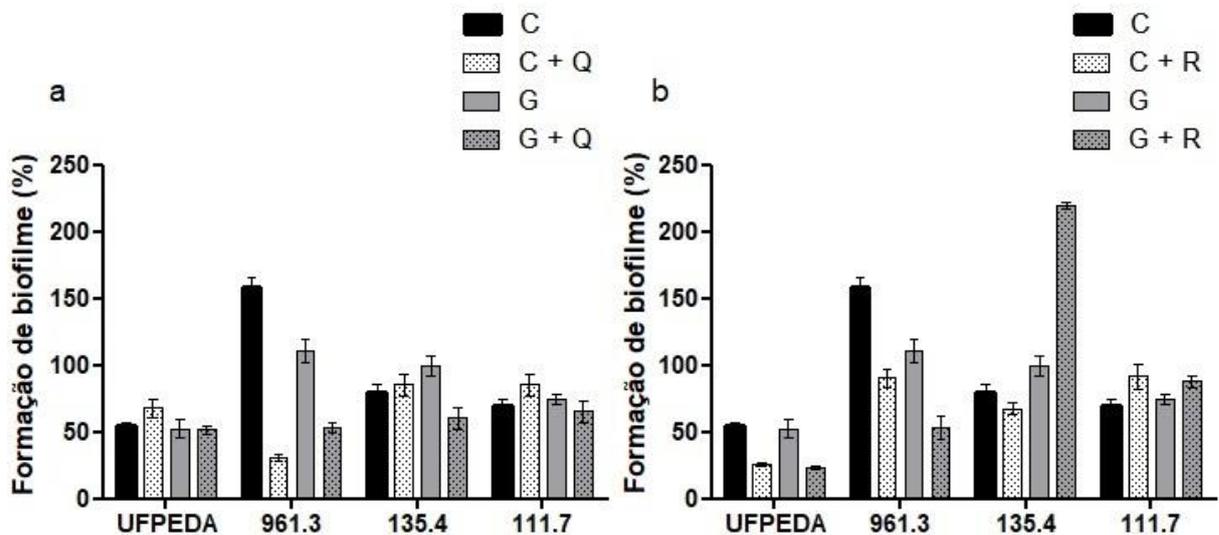
A quercetina em associação não interferiu na formação de biofilme da maioria das cepas, com exceção da 961.3. Neste isolado a ciprofloxacina e a gentamicina sozinhos estimularam a formação de biofilme, mas na associação com a quercetina eles passaram a inibir a formação

de biofilme em mais de 50% (Gráfico 2a). A quercetina possui atividade contra o biofilme de *E. faecalis*, *S. aureus*, *Streptococcus mutans*, *E. coli* e *P. aeruginosa* [32].

A associação quercetina-gentamicina já se mostrou eficiente contra o biofilme de *P. aeruginosa*, onde o efeito sinérgico é atribuído à capacidade de inibição de *Quorum sensing* da quercetina [33]. Até o momento, nenhum resultado foi encontrado sobre a associação da quercetina com a ciprofloxacina em nenhuma espécie e nem sobre a associação da quercetina com gentamicina em *E. faecalis*.

Rutina agiu inibindo a formação de biofilme na UFPEDA e 961.3 em associação com os dois antibióticos e na associação com a ciprofloxacina na 134.5. Mas estimulou bastante a formação de biofilme na 134.5 quando em associação com a gentamicina (Gráfico 2b).

Gráfico 2: Formação de biofilme (%) dos antibióticos isolados (100 µg/mL) e (a) associação da quercetina (1000 µg/mL) com os antibióticos (100 µg/mL); (b) associação da rutina (1000 µg/mL) com os antibióticos (100 µg/mL).



A rutina possui capacidade antibiofilme contra *P. aeruginosa* [37], *S. aureus*, *E. coli* e *B. subtilis* [35]. Este composto, quando com a gentamicina, teve efeito sinérgico na redução do biofilme de *P. aeruginosa*. Essa combinação resultou em significativa redução na produção de EPS pela bactéria, que é responsável pela aderência e maturação do biofilme, indicando um possível mecanismo de ação na associação [34]. Além disso, Jhanji et al. [35] mostraram que a

rutina tem a capacidade de inibir a bomba de efluxo de *P. aeruginosa*, podendo ser um outro mecanismo que explique a ação sinérgica da rutina com antibióticos.

4.4 CONCLUSÃO:

A quercetina se mostrou eficiente com a associação da gentamicina e da ciprofloxacina na inibição do crescimento bacteriano de *E. faecalis*. Já a rutina, quando em associação com esses antibióticos, se mostrou melhor na inibição do biofilme bacteriano. Esses dois compostos atuam em mecanismos distintos da bactéria, tornando-a mais sensível à ação do medicamento.

Mais estudos devem ser feitos para entender o mecanismo onde a combinação age, mas a associação com esses dois compostos se mostra promissora contra a formação de biofilme e o crescimento de *Enterococcus faecalis*.

Tabela 2: Crescimento bacteriano (%) na associação da rutina e quercetina (1000 µg/mL) com ciprofloxacina e gentamicina em diferentes concentrações.

Composto fenólico	Bactéria	Ciprofloxacina (µg/mL)					Gentamicina (µg/mL)				
		100	50	25	12,5	6,25	100	50	25	12,5	6,25
Rutina	UFPEDA	52±16	41,8±15	50,9±15	55,5±6	54±11,5	30,6±4	31,5±7	28,1±5,7	59,1±9,5	47±9
	961.3	89,8±9,7	117±18	104±10	110±4	106±8	77,4±10	80±10	87±11	64±3	51±9,6
	135.4	15,9±2,9	137±4	101±5,6	76,7±4	78±11	79±10	200±8	128±2	145±6	158±11,6
	111.7	66±9,6	176±14	135±13	89±16	78±11	73,8±11	220±22	182±10	233±4	210±9
Quercetina	UFPEDA	5,7±5,4	9,8±3,7	9,4±5,7	14±6,5	13,9±4	10,6±5	0±3,6	0±13	0±12	0±10
	961.3	16,2±4	16,8±13	20±12	26,7±10	21,5±12	0±8	0±8	0±9	0±13	0±8
	135.4	0,8±1,9	33,7±12	47±5	50,5±5	48±2	38,7±7,5	43±7	60±14	27±8,5	50±12
	111.7	16,6±7,6	22,6±6	26,3±7	30,2±2	25±8	19,3±0,7	19±3	21,4±9	0±2	21,2±13

Tabela 3: Formação de biofilme (%) na associação de rutina e quercetina (1000 µg/mL) com ciprofloxacina e gentamicina em diferentes concentrações.

Composto fenólico	Bactéria	Ciprofloxacina (µg/mL)					Gentamicina (µg/mL)				
		100	50	25	12,5	6,25	100	50	25	12,5	6,25
Rutina	UFPEDA	25±0,9	26±1	28±1,4	28,3±1,4	25±0,6	23,2±1	23,5±1,2	29,6±4	38±2,8	38±4,5
	961.3	90±6	80±9	95,5±13	90±11,3	90±7,8	53±10	58,6±11	50±4,5	56±7,7	63±8
	135.4	67,4±4	95±10	96,6±6,5	141,6±10	136±9	220±2,5	142±10,5	152,6±12,4	144,5±11	127±11,4
	111.7	91,6±9	55,5±3	62,4±4	65,5±6,7	74±3,8	88±4,5	68±6	67,5±6,6	64±6,4	60±3,6
Quercetina	UFPEDA	68±6,8	60,5±4	59±5	58±6	52,7±4	51±3	53±5	57±8	77±7	97±9
	961.3	31±3	43±9	48±10	58±8,4	57,5±8	53,6±4	50±6	55±3	53±2	56±4
	135.4	85,3±12	86±±6,4	81±8,5	87±10	71±7,5	60,5±8	62±4	72±10,4	65,5±8	73±7
	111.7	85±12	88±6	81±8,5	87±10,6	71±7,5	65,5±12	61,6±4,4	72±10,4	65,5±8	73±7

4.5 REFERÊNCIAS:

- [1] Aslam B, Wang W, Arshad MI, Khurshid M, Muzammil S, Rasool MH, et al. Antibiotic resistance: a rundown of a global crisis. *Infection and drug resistance* 2018;11:1645-1658.
- [2] Peterson E, Kaur P. Antibiotic resistance mechanisms in bacteria: relationships between resistance determinants of antibiotic producers, environmental bacteria, and clinical pathogens. *Front. Microbiol.* 2018;9:2928.
- [3] Campos ACFB, Souza NR, Silva PHC, Santana AP. Resistência antimicrobiana em *Enterococcus faecalis* e *Enterococcus faecium* isolados em carcaça de frango. *Pesq. Vet. Bras.* 2013;33:575-580.
- [4] Merlo TP. Comparação genotípica e fenotípica de *Enterococcus faecalis* resistentes à vancomicina isolados nos anos 2009 e 2011 em um hospital de Minas Gerais. Thesis (Master in Physics) – São Carlos Institute of Physics, São Paulo University 2013.
- [5] Torres C, Alonson CA, Ruiz-Ripa L, León-Sampedro R, Del Campo R, Coque TM. Antimicrobial resistance in *Enterococcus* spp. of animal origin. *Microbiology Spectrum* 2018;6:4, 2018.
- [6] Sundsfjord A, Willems R. Enterococcus research: recent developments and clinical challenges. *Clinical Microbiology and Infection* 2010;16(6):525-526.
- [7] Costerton JW. Introduction to biofilm. *International journal of antimicrobial agents* 1999;11(3-4):217-221.
- [8] Stoodley P, Cargo R, Rupp CJ, Wilson S, Klapper I. Biofilm material properties as related to shear-induced deformation and detachment phenomena. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* 2002;29:361-367.
- [9] Flemming H, Wingender J, Szewzyk U, Steinberg P, Rice SA, Kjelleberg S. Biofilms: an emergent form of bacterial life. *Nature reviews: Microbiology* 2016;16:563-575.

- [10] Hall CW, Mah TF. Molecular mechanisms of biofilm-based antibiotic resistance and tolerance in pathogenic bacteria. *FEMS microbiology reviews* 2017;41(3):276-301.
- [11] Nathan C, Cars O. Antibiotic resistance—problems, progress, and prospects. *New England Journal of Medicine* 2014;371(19):1761-1763.
- [12] Peng Z, Ling L, Stratton CW, Li C, Polage CR, Wu B, et al. Advances in the diagnosis and treatment of *Clostridium difficile* infections. *Emerging microbes & infections* 2018;7(1):1-13.
- [13] Fischbach MA. Combination therapies for combating antimicrobial resistance. *Current opinion in microbiology* 2011;14(5):519-523.
- [14] Cushnie TT, Lamb AJ. Antimicrobial activity of flavonoids. *International journal of antimicrobial agents* 2005;26(5):343-356.
- [15] Silva LN, Zimmer KR, Macedo AJ, Trentin DS. Plant natural products targeting bacterial virulence factors. *Chemical review* 2016;116:9162-9236..
- [16] Pereira V, Dias C, Vasconcelos MC, RosaE, Saavedra MJ. Antibacterial activity and synergistic effects between *Eucalyptus globulus* leaf residues (essential]l oils and extracts) and antibiotics against several isolates of respiratory tract infections (*Pseudomonas aeruginosa*). *Industrial Crops and Products* 2014;52:1-7.
- [17] Lim A, Subhan N, Jazayeri JA, John G, Vanniasinkam T, Obied HK. Plant phenols as antibiotic boosters: in vitro interaction of olive leaf phenols with ampicillin. *Phytotherapy research* 2016;30(3):503-509.
- [18] Sanhueza L, Melo R, Montero R, Maisey K, Mendoza L, Wilkens M. Synergistic interactions between phenolic compounds identified in grape pomace extract with antibiotics of different classes against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. *PloS one* 2017;12(2):e0172273.

- [19] EUCAST. EUCAST guidelines for the detection of specific resistance and mechanisms of clinical and/or epidemiological importance. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing 2017.
- [20] Stepanovic S, Vukovic D, Hola V, Bonaventura GD, Djuric S., Ćirkovic I, et al. Quantification of biofilm in microtiter plates: overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by *Staphylococci*. *Apmis* 2007;115:8:891-899.
- [21] Kristich CJ, Rice LB, Arias CA. Enterococcal infection—treatment and antibiotic resistance. *Enterococci: From commensals to leading causes of drug resistant infection*, Boston:Massachusetts Eye and Ear Infirmary, Boston, 2014, pp. 123-184.
- [22] Pericas JM, Cervera C, Del Rio A, Moreno A, Garcia de la Maria C, Almela M, et al. Changes in the treatment of *Enterococcus faecalis* infective endocarditis in Spain in the last 15 years: from ampicillin plus gentamicin to ampicillin plus ceftriaxone. *Clinical Microbiology and Infection* 2014;;20(12):O1075-O1083.
- [23] BRCAS. Cut-off tables for interpreting CIMs and halo diameters. Brazilian Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing, 2020.
- [24] Bustos PS, Deza-Ponzio R, Páez PL, Albesa I, Cabrera JL, Virgolini MB, et al. Protective effect of quercetin in gentamicin-induced oxidative stress in vitro and in vivo in blood cells. Effect on gentamicin antimicrobial activity. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 2016;48:253–264.
- [25] Vipin C, Mujeeburahiman M, Saptami K, Arun AB, Rekha PD. Synergistic interactions of quercetin with antibiotics against biofilm associated clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* in vitro. *bioRxiv* 2019, 601336.

- [26] Amin MU, Khurram M, Khattak B, Khan J. Antibiotic additive and synergistic action of rutin, morin and quercetin against methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. BMC Complementary and Alternative Medicine 2015;15:59.
- [27] Qu S, Dai C, Shen Z, Tang Q, Wang H, Zhai B, et al. Mechanism of synergy between tetracycline and quercetin against antibiotic resistant *Escherichia coli*. Frontiers in microbiology 2019, 10, 2536.
- [28] Wang S, Yao J, Zhou B, Yang J, Chaudry MT, Wang M, et al. Bacteriostatic effect of quercetin as an antibiotic alternative in vivo and its antibacterial mechanism in vitro. *Journal of food protection* 2018;81(1):68-78.
- [29] Murad T, Sabbagh G, Al-Kayali RAWAA. In vitro interaction of ciprofloxacin and some natural compounds against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. In vitro 2017;5(1).
- [30] Jayaraman P, Sakharkar MK, Lim CS, Tang TH, Sakharkar KR. Activity and interactions of antibiotic and phytochemical combinations against *Pseudomonas aeruginosa* in vitro. International journal of biological sciences 2010;6(6):556.
- [31] Araruna MK, Brito SA, Morais-Braga MF, Santos KK, Souza TM, Leite TR, et al. Evaluation of antibiotic & antibiotic modifying activity of pilocarpine & rutin. The Indian journal of medical research 2012;135(2):252.
- [32] Memariani H, Memariani M, Ghasemian A. An overview on anti-biofilm properties of quercetin against bacterial pathogens. World Journal of Microbiology and Biotechnology 2019;35(9):1-16.
- [33] Vipin C, Saptami K, Fida F, Mujeeburahiman M, Rao SS, Arun AB, et al. Potential synergistic activity of quercetin with antibiotics against multidrug-resistant clinical strains of *Pseudomonas aeruginosa*. PloS one 2020;15(11):e0241304.

- [34] Deepika MS, Thangam R, Sakthidhasan P, Arun S, Sivasubramanian S, Thirumurugan R. Combined effect of a natural flavonoid rutin from *Citrus sinensis* and conventional antibiotic gentamicin on *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation. *Food Control* 2018;90:282-294.
- [35] Jhanji R, Bhati V, Singh A, Kumar A. Phytomolecules against bacterial biofilm and efflux pump: An In silico and In vitro study. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics* 2019;1–12.doi:10.1080/07391102.2019.1704884

5 CONCLUSÃO

- A presença de isolados classificados como MDR indicam a aquisição de resistência a diferentes classes de antibióticos pela espécie e a presença desses isolados em hospitais;
- Os 12 isolados coletados de hospitais e a cepa padrão UFPEDA 09 de *E. faecalis* são formadores de biofilme;
- Não houve uma relação direta entre a hidrofobicidade bacteriana e a capacidade de formação de biofilme dos isolados;
- Há pelo menos um dos genes de virulência em 11 dos 12 isolados hospitalares;
- Os quatro isolados utilizados para avaliar a associação se mostraram resistentes à ciprofloxacina e gentamicina até a concentração de 100 µg/mL;
- A associação da quercetina (1000 µg/mL) com ciprofloxacina ou gentamicina (100 µg/mL) se mostrou eficiente na redução do crescimento bacteriano de *E. faecalis*. E, ao contrário da quercetina, a associação com a rutina aumentou o crescimento bacteriano;
- Quanto à formação de biofilme, a quercetina não se mostrou eficiente nas associações, enquanto a rutina obteve bons resultados na inibição do biofilme quando em associação com a ciprofloxacina;

REFERÊNCIAS

- AGHDAM, M. A., BARHAGHI, M. H. S., AGHAZADEH, M., JAFARI, F., HAGH, M. B., HAGHDOOST, M., MEMAR, M. Y., REZAEI, A. M., KAFIL, H. S. Virulence genes in biofilm producer *Enterococcus faecalis* isolates from root canal infections. **Celular and molecular biology**, v. 63(5), p. 55-59, 2017.
- AMIN, M. U., KHURRAM, M., KHATTAK, B., KHAN, J. Antibiotic additive and synergistic action of rutin, morin and quercetin against methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. **BMC Comp. Alt. Medicine**, v. 15, 2015.
- ANVISA (2019). Controle de infecção hospitalar: balanço e reflexões. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária**. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/noticias>
- ARARUNA, M. K., BRITO, S. A., MORAIS-BRAGA, M. F., SANTOS, K. K., SOUZA, T, M., LEITE, T. R., et al. Evaluation of antibiotic & antibiotic modifying activity of pilocarpine & rutin. **The Indian journal of medical research**,v. 135(2), p. 252, 2012.
- ARIAS, C. A., CONTRERAS, G. A., MURRAY, B. E. Management of multidrog-resistant enterococcal infections. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 16:6, p. 555-562, 2010.
- ASLAM, B., WANG, W., ARSHAD, M. I., KHURSHID, M., MUZAMMIL, S., RASOOL, M. H., et al. Antibiotic resistance: a rundown of a global crisis. **Infection and drug resistance**, v.11, p. 1645-1658, 2018.
- AYAZ, F.A., HAYIRLIOGLU-AYAZ, S., ALPAY-KARAOGLU, S., GRUZ, J., VALENTOVA, K., ULRICHOVA, J., STRNAD, M. Phenolic acid contents of kale (*Brassica oleracea* L. var. *acephala* DC.) extracts and their antioxidant and antibacterial activities. **Food Chem.**, v. 107, p. 19-25, 2008.
- BANIN, E., VASIL M. L., GREENBERG, E. P. Iron and *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 102, n. 31, p. 11076-11081, 2005.
- BARROS, M. V. Infecções nosocomiais por *Enterococcus faecalis*. **Universidade Fernando Pessoa – Faculdade Ciências da Saúde**. Porto, 2014.
- BÄUMLER, A. J., SPERANDIO, V. Interactions between the microbiota and pathogenic bacteria in the gut. **Nature**, v. 535(7610), p. 85-93, 2016.
- BBOSA, G. S., MWEBAZA, N., ODDA, J., KYEGOMBE, D. B., NTALE, M. Antibiotics/antibacterial drug use, their marketing and promotion during the post-antibiotic golden age and their role in emergence of bacterial resistance. **Health**, v. 2014, p. 410-425, 2014.
- BEGANOVIC, M., LUTHER, M. K., RICE, L. B., ARIAS, C. A., RYBAK, M. J., LAPLANTE, K. L. A review of combination antimicrobial therapy for *Enterococcus faecalis* bloodstream infections and infective endocarditis. **Reviews of anti-infective agents**, v. 67, n. 2., p. 303-309, 2018.
- BELOIN, C., ROUX, A., GHIGO, J. M. *Escherichia coli* biofilms. **In Bacterial biofilms** (pp. 249-289). Springer, Berlin, Heidelberg. 2008.

BORGES, A., SAAVEDRA, M. J., SIMÕES, M. The activity of ferulic and gallic acids in biofilm prevention and control of pathogenic bacteria. **Biofouling**, v. 28, n. 7, p. 755-767, 2012.

BOUND, D. J., MURTHY, P. S., SRINIVAS, P. Synthesis and antibacterial properties of 2,3-dideoxyglucosides of terpene alcohols and phenols. **Food chemistry**, v. 185, p. 192-199, 2005.

BOYNUKARA, B, EKIN, IH, AKSAKAL, A, GÜLHAN, T. Isolation and antibiotic susceptibility of enterococci from human, dog and cat faeces. *Vet Mikrobiyol Derg* 2002; 3, 37-42.

BRCAST. Cut-off tables for interpreting CIMs and halo diameters. Brazilian Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing, 2020.

BUSTOS, P. S., DEZA-PONZIO, R., PÁEZ, P. L., ALBESA, I., CABRERA, J. L., VIRGOLINI, M. B., et al. Protective effect of quercetin in gentamicin-induced oxidative stress in vitro and in vivo in blood cells. Effect on gentamicin antimicrobial activity. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v.48, p. 253–264, 2016.

CAMPOS, A. C. F. B., SOUZA, N. R., SILVA, P. H. C., SANTANA, A. P. Resistência antimicrobiana em *Enterococcus faecalis* e *Enterococcus faecium* isolados em carcaça de frango. **Pesq. Vet. Bras.**, v. 33, n. 5, p. 575-580, 2013.

CARTEA, M. E., FRANCISCO, M., SOENGAS, P., VELASCO, P. Phenolic compounds in Brassica vegetables. **Molecules**, v. 16, p. 251-280, 2011.

CAVACO, L. M., BERNAL, J. F., ZANKARI, E., LÉON, M., HENDRIKSEN, R. S., PEREZ-GUTIERREZ, E., AERESTRUP, F. M. e DONADO-GODOY, P. Detection of linezolid resistance due to the *oprA* gene in *Enterococcus faecalis* from poultry meat from the American continent (Colombia). **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, 2016.

CECI, M, DELPECH, G, SPARO, M, MEZZINA, V, BRUNI, SS, BALDACCINI, B. Clinical and microbiological features of bacteremia caused by *Enterococcus faecalis*. **The Journal of Infection in Developing Countries** 2015, 9:11, 1195-1203, 2015.

CEYLAN, O., ALIC, H. Antibiofilm, antioxidant, antimutagenic activities and phenolic compounds of *Allium orientale* BOISS. **Brazilian archives of biology and technology**, v. 58(6), p. 935-943, 2015.

CH'NG, J., CHONG, K. K. L., LAM, L. N., WONG, J. J. e KLINE, K. A. Biofilm-associated infection by enterococci. **Nature Reviews Microbiology**, v. 17, p. 82-94, 2019.

CHAJECKA-WIERZCHOWSKA, W., ZADERNOWSKA, A., LANIEWSKA-TROKENHEIM, L. Virulence factors of *Enterococcus* spp. presented in food. **LWT – Food, Science and Technology**, v. 75, p. 670-676, 2017.

COSTERTON, J.W., STEWART, P.S., GREENBERG, E.P. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. **Microbes, Immunity and Disease**, v. 284, p. 1318-1322, 1999.

CUEVA, C., MORENO-ARRIBAS, M. V., MARTÍN-ÁLVAREZ, P. J., BILLS, G., VICENTE, M. F., BASILIO, A., RIVAS, C. L., REQUENA, T., RODRÍGUEZ, J. M., BARTOLOMÉ, B. Antimicrobial activity of phenolic acids against comensal, probiotic and pathogenic bacteria. **Research in Microbiology**, v. 161, p. 372-382, 2010.

CUSHNIE, T. T., LAMB, A. J. Antimicrobial activity of flavonoids. **International journal of antimicrobial agents**, v. 26(5), p. 343-356. 2005.

DABIRI, S, SHAMS-GHAHFAROKHI, M, RAZZAGHI-ABYANEH, M. Comparative analysis of proteinase, phospholipase, hydrophobicity and biofilm forming ability in *Candida* species isolated from clinical specimens. *Journal De Mycologie Médicale* 2018; 28:3, 437-442.

DAVIES, D. Understanding biofilm resistance to antibacterial agents. **Nature reviews Drug discovery**, v. 2 (2), p. 114-122, 2003.

DE REZENDE, F. M., ROSADO, D., MOREIRA, F. A., DE CARVALHO, W. R. S. Vias de síntese de metabólitos secundários em plantas. In: Hidalgo, E. M. da P. (org.). **VI Botânica no Inverno 2016**, São Paulo: Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, Departamento de Botânica, 2016.

DEEPIKA, M. S., THANGAM, R., SAKTHIDHASAN, P., ARUN, S.; SIVASUBRAMANIAN, S., THIRUMURUGAN, R. Combined effect of a natural flavonoid rutin from *Citrus sinensis* and conventional antibiotic gentamicin on *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation. **Food Control**, v. 90, p. 282-294, 2018.

DODDS, D. R. Antibiotic resistance: a current epilogue. **Biochemical Pharmacology**, 2016. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bcp.2016.12.005>

DONLAN, R.M. Biofilms: microbial life on surfaces. **Emerging Infectious Diseases**, v. 8(9), p. 881-890, 2002.

DONLAN, R.M., CONSTERTON, J.W. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. **Clinical microbiology review**, p. 167-193, 2002.

EUCAST. EUCAST guidelines for the detection of specific resistance and mechanisms of clinical and/or epidemiological importance. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing 2017.

FARAH, A., DONANGELO, C. M. Phenolic compounds in coffee. **Braz. J. Plant Physiol.**, v. 18(1), p. 23-26, 2006.

FIGUEREDO, R. A. M., OLIVEIRA, J. T., SILVA, A. M. T. C. e ATAÍDES, F. S. Enterococcus resistente à vancomicina: uma preocupação em expansão no ambiente hospitalar. **Journal of Infection Control**, v. 6(1), p. 11-15, 2016.

FISCHBACH, M. A. Combination therapies for combating antimicrobial resistance. **Current opinion in microbiology**, v. 14(5), p. 519-523, 2011.

FISHER, K., PHILLIPS, C. The ecology, epidemiology and virulence of *Enterococcus*. **Microbiology**, v. 155(6), p. 1749-1757, 2009.

- FLEMMING, H., WINGENDER, J. The biofilm matrix. **Nature reviews: Microbiology**, v. 8, p. 623-633, 2010.
- FLEMMING, H., WINGENDER, J., SZEWZYK, U. STEINBERG, P., RICE, S.A., KJELLEBERG, S. Biofilms: an emergent form of bacterial life. **Nature reviews: Microbiology**, v. 16, p.563-575, 2016.
- FRIERI, M., KUMAR, K., BOUTIN, A. Antibiotic resistance. **Jorn. Of Infection and Public Health**, v. 10, p. 369-378, 2017.
- GARCÍA-SOLACHE, M. e RICE, L. B. The Enterococcus: a model of adaptability to its environment. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 32(2), p. e00058-18, 2019.
- GUZMAN PIETRO, A. M., van SCHAIK, W., ROGERS, M. R. C., COQUE, T. M., BAQUERO, F., CORANDER, J. e WILLEMS, R. J. L. Global emergence and dissemination of enterococci as nosocomial pathogens: attack of the clones? **Frontiers in Microbiology**, v. 7, 2016.
- HAKIKI, D., MOODUTO, L., SUARDITA, K., & WAHJUNINGRUM, D. A. Effectiveness of flavonoid from mangosteen pericarp (*Garcinia mangostana* L.) as *Enterococcus faecalis* antibiofilm. **Conservative Dentistry Journal**, v. 7(1), p. 18-22, 2017.
- HALL, C. W., MAH, T. F. Molecular mechanisms of biofilm-based antibiotic resistance and tolerance in pathogenic bacteria. **FEMS microbiology reviews**, v. 41(3), p. 276-301, 2017
- HARBORNE, J. B.; SIMMONDS, N. W. Biochemistry of phenolic compounds, London: **Acad. Press, London**, p. 101, 1964.
- HASHEM, YA, AMIN, HM, ESSAM, TM, YASSIN, AS, AZIZ, RK. Biofilm formation in enterococci: genotype-phenotype correlations and inhibition by vancomycin. *Scientific Reports* 2017; 7. <http://doi.org/10.1038/s41598-017-05901-0>
- HEIDARI, H., EMANEINI, M., DABIRI, H. e JABALAMELI, F. Virulence factors, antimicrobial resistance pattern and molecular analysis of Enterococcal strains isolated from burn patients. **Microbial Pathogenesis**, v. 90, p. 93-97, 2016.
- HENRIQUES, A., VASCONCELOS, C., CERCA, N. A importância dos biofilmes nas infecções nosocomiais – O estado da arte. **Arquivos de Medicina**, v. 27, p. 27-36, 2013.
- HIRT, H., GREENWOOD-QUAINTANCE, K. E., KARAU, M. J., TILL, L. M., KASHYAP, P. C., PATEL, R., DUNNY, G. M. *Enterococcus faecalis* sex pheromone cCF10 enhances conjugative plasmid transfer in vivo. **mBio** 9:e00037-18, 2018. <https://doi.org/10.1128/mBio.00037-18>.
- HOLMBERG, A., RASMUSSEN, M. Mature biofilms of *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* are highly to antibiotics. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 84, p. 19-21, 2016.
- HUBER, B., EBERL, L., FEUCHT, W., POLSTER, J. Influence of polyphenols on bacterial biofilm formation and quorum-sensing. **Zeitschrift für Naturforschung C**, v. 58, n. 11-12, p. 879-884, 2003.

HUTCHINGS, M. I., TRUMAN, A. W., WILKINSON, B. Antibiotics: past, present and future. **Current opinion in Microbiology**, v. 51, p. 72-80, 2019.

IBRAHIM, I. A. J. Study the Effect of some Medical Plants in Biofilm Formation and Antibiotic Sensitivity for Klebsiella Pneumoniae. **Iraqi Journal of Science**, v. 58, n. 2C, p. 971-983, 2017.

IGBNOSA, EO, BESHIRU, A. Antimicrobial resistance, virulence determinants, and biofilm formation of *Enterococcus* species from ready-to-eat seafood. *Frontiers in microbiology* 2019; 10, 728.

ITZIA AZUCENA, R. C., JOSÉ ROBERTO, C. L., MARTIN, Z. R., RAFAEL, C. Z., LEONARDO, H. H., GABRIELA, T. P., ARACELI, C. R. Drug Susceptibility Testing and Synergistic Antibacterial Activity of Curcumin with Antibiotics against Enterotoxigenic *Escherichia coli*. **Antibiotics**, v. 8(2), p. 43, 2019.

JAHANSEPAS, A, AGHAZADEH, M, REZAEI, MA, HASANI, A, SHARIFI, Y, AGHAZADEH, T, MARDENEH, J. Occurrence of *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* in various clinical infections: detection of their drug resistance and virulence determinants. *Microbial drug resistance* 2018; 24:1, 76-82.

JAMAL, M., AHMAD, W., ANDLEEB, S., JALIL, F., IMRAN, M., NAWAZ, M. A., et al. Bacterial biofilm and associated infections. **Journal of the Chinese Medical Association**, v. 81(1), p. 7-11, 2018.

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

JHANJI, R., BHATI, V., SINGH, A., KUMAR, A. Phytomolecules against bacterial biofilm and efflux pump: An In silico and In vitro study. **Journal of Biomolecular Structure and Dynamics**, v.1–12, 2019.doi:10.1080/07391102.2019.1704884

KALI, A., DEVARAJ BHUVANESHWAR, P., CHARLES, M. V., SEETHA, K. S. Antibacterial synergy of curcumin with antibiotics against biofilm producing clinical bacterial isolates. **Journal of basic and clinical pharmacy**, v. 7(3), p. 93, 2016.

KANAAN, H., EL-MESTRAH, M., SWEIDAN, A., AS-SADI, F., BAZZAL, A. A., CHOKR, A. Screening for antibacterial and antibiofilm activities in *Astragalus angulosus*. **J. Intercult Ethnopharmacol**, v. 6(1), p. 50-57, 2016.

KIRUTHIGA, A, PADMAVATHY, K, SHABANA, P, NAVEENKUMAR, V, GNANADESIKAN, S, MALAIYAN, J. Improved detection of *esp*, *hyl*, *asaI*, *gelE*, *cylA* virulence genes among clinical isolates of Enterococci. *BMC Res Notes* 2020; 13:170.

KOO, H., HAYACIBARA, M. F., SCHOBEL, B. D., CURY, J. A., ROSALEN, P. L., PARK, Y. K., ... & BOWEN, W. H. Inhibition of *Streptococcus mutans* biofilm accumulation and polysaccharide production by apigenin and tt-farnesol. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 52(5), p. 782-789, 2003.

KRISTICH, C. J, RICE, L. B., ARIAS, C. A. Enterococcal infection—treatment and antibiotic resistance. Enterococci: From commensals to leading causes of drug resistant infection, **Boston:Massachusetts Eye and Ear Infirmary**, Boston, 2014, pp. 123-184.

KUMAR, G. S., JAYAVEERA, K. N., KUMAR, C. K., SANJAY, U. P., SWANY, B. M., KUMAR, D. V. Antimicrobial effects of Indian medicinal plants against acne-inducing bacteria. **African Journals Online**, v. 6(2), 2007.

LANGEVELD, W. T., VELDHUIZEN, E. J., BURT, S. A. Synergy between essential oil components and antibiotics: a review. **Critical reviews in microbiology**, v. 40(1), p. 76-94, 2014.

LEBRETON, F., MANSON, A. L., SAAVEDRA, J. T., STRAUB, T. J., EARL, A. M., GILMORE, M. S. Tracing the Enterococci from paleozoic origins to the hospital. **Cell**, v. 169, p. 849-861, 2017.

LIM, A., SUBHAN, N., JAZAYERI, J. A., JOHN, G., VANNIASINKAM, T., OBIED, H. K. Plant phenols as antibiotic boosters: *in vitro* interaction of olive leaf phenols with ampicillin. **Phytoterapy Research**, v. 30, p. 503-509, 2016.

LIMA, V. N., OLIVEIRA-TINTINO, C. D., SANTOS, E. S., MORAIS, L. P., TINTINO, S. R., FREITAS, T. S., GERALDO, Y. S., PEREIRA, R. L. S., CRUZ, R. P., MENEZES, I. R. A., COUTINHO, H. D. M. Antimicrobial and enhancement of the antibiotic activity by phenolic compounds: Gallic acid, caffeic acid and pyrogallol. **Microbial pathogenesis**, v. 99, p. 56-61, 2016.

LIU, M., WU, X., LI, J., LIU, L., ZHANG, R., SHAO, D., DU, X. The specific anti-biofilm effect of gallic acid on *Staphylococcus aureus* by regulating the expression of the *ica* operon. **Food Control**, v. 73, p. 613-618, 2017.

LUÍS, A., SILVA, F., SONIA, S., DUARTE, A. P., DOMINGUES, F. Antistaphylococcal and biofilm inhibitory activities of gallic, caffeic, and chlorogenic acids. **Biofouling**, v. 30(1), p. 69-79, 2013.

MAH, T. Biofilm-specific antibiotic resistance. **Future microbiology**, v. 9, p. 1061-1072, 2012.

MEMARIANI, H.; MEMARIANI, M.; GHASEMIAN, A. An overview on anti-biofilm properties of quercetin against bacterial pathogens. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 35, n. 9, p. 143, 2019.

MERLO, TP. Comparação genotípica e fenotípica de *Enterococcus faecalis* resistentes à vancomicina isolados nos anos 2009 e 2011 em um hospital de Minas Gerais [Mater's thesis]. São Carlos: Instituto de Física de São Carlos da Universidade de São Paulo (USP); 2013.

MIRANI, ZA, FATIMA, A, UROOJ, S, AZIZ, M, KHAN, MN, ABBAS, T. Relationship of cell surface hydrophobicity with biofilm formation and growth rate: A study on *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, and *Escherichia coli*. **Iranian J Basic Med Sci** 2018; 21, 760-769.

MOHAMED, J. A.; HUANG, D. B. Biofilm formation by enterococci. **Journal of medical microbiology**, v. 56, n. 12, p. 1581-1588, 2007.

Murad T, Sabbagh G, Al-Kayali RAWAA. In vitro interaction of ciprofloxacin and some natural compounds against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *In vitro* 2017;5(1).

NAGOSHI, C., SHIOTA, S., KURODA, T., HATANO, T., YOSHIDA, T., KARIYAMA, R., TSUCHIYA, T. Synergistic effect of [10]-gingerol and aminoglycosides against vancomycin-resistant enterococci (VRE). **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 29(3), p. 443-447, 2016.

NATHAN, C., CARS, O. Antibiotic resistance—problems, progress, and prospects. **New England Journal of Medicine**, v. 371(19), p. 1761-1763, 2014.

NGUYEN, M. T., KRYACHKO, E. S., VANQUICKENBORNE, L. G. General and theoretical aspects of phenol. **The chemistry of phenols**, p. 1-198, 2003.

O'TOOLE, G., KAPLAN, H. B., KOLTER, R. Biofilm formation as microbial development. *Annu. Rev. Microbiol.*, v. 54, p. 49-79, 2000.

OH, E., JEON, B. Synergistic anti-Campylobacter jejuni activity of fluoroquinolone and macrolide antibiotics with phenolic compounds. **Frontiers in microbiology**, v. 6, p. 1129, 2015.

ONSARE, J. G.; ARORA, D. S. Antibiofilm potential of flavonoids extracted from Moringa oleifera seed coat against Staphylococcus aureus, Pseudomonas aeruginosa and Candida albicans. **Journal of applied microbiology**, v. 118, n. 2, p. 313-325, 2015.

PANCHE, A. N., DIWAN, A. D., CHANDRA, S. R. Flavonoids: an overview. **Journal of nutritional science**, v. 5, p. 1-15, 2016.

PEJIN, B., CIRIC, A., GLAMOCLJIA, J., NIKOLIC, M., STANIMIROVIC, B., & SOKOVIC, M. Quercetin potently reduces biofilm formation of the strain Pseudomonas aeruginosa PAO1 in vitro. **Current Pharmaceutical Biotechnology**, v. 16(8), p. 733-737, 2015.

PENG, Z., LING, L., STRATTON, C. W., LI, C., POLAGE, C. R., WU, B., et al. Advances in the diagnosis and treatment of Clostridium difficile infections. **Emerging microbes & infections**, v.7(1), p. 1-13, 2018.

PEREIRA, V., DIAS, C., VASCONCELOS, M. C., ROSA, E., SAAVEDRA, M. J. Antibacterial activity and synergistic effects between Eucalyptus globulus leaf residues (essential oils and extracts) and antibiotics against several isolates of respiratory tract infections (*Pseudomonas aeruginosa*). **Industrial Crops and Products**, v. 52, p. 1-7, 2014.

PERICAS, J. M., CERVERA, C., DEL RIO, A., MORENO, A., GARCIA DE LA MARIA, C., ALMELA, M., et al. Changes in the treatment of Enterococcus faecalis infective endocarditis in Spain in the last 15 years: from ampicillin plus gentamicin to ampicillin plus ceftriaxone. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 20(12):O1075-O1083, 2014.

PETERSON, E., KAUR, P. Antibiotic resistance mechanisms in bacteria: relationships between resistance determinants of antibiotic producers, environmental bacteria, and clinical pathogens. **Front. Microbiol.**;9:2928, 2018.

PRATT, L.A. AND KOLTER, R. Genetic analyses of bacterial biofilm formation. *Current opinion in microbiology*, v. 2(6), p. 598-603, 1999.

QU, S., DAI, C., SHEN, Z., TANG, Q., WANG, H., ZHAI, B., et al. Mechanism of synergy between tetracycline and quercetin against antibiotic resistant *Escherichia coli*. **Frontiers in microbiology**, v. 10, p. 2536, 2019.

QUATRIN, P.M., VERDI, C.M., SOUZA, M.E., GODOI, S.N., KLEIN, B., GUNDEL, A., WANGER, R., VAUCHER, R.A., OURIQUE, A.F., SANTOR, R.C.V. Antimicrobial and antibiofilm activities of nanoemulsions containing Eucalyptus globulus oil against *Pseudomonas aeruginosa* and *Candida* spp. **Microbial Pathogenesis**, 2017.

REISNER, A., KROGFELT, K. A., KLEIN, B. M., ZECHNER, E. L., MOLIN, S. In vitro biofilm formation of commensal and pathogenic *Escherichia coli* strains: impact of environmental and genetic factor. **Journal of bacteriology**, p. 3572-3581, 2006.

REMSCHMIDT, C., SCHRÖDER, C., BEHNKE, M., GASTMEIER, P., GEFFERS, C. e KRAMER, T. S. Continuous increase of vancomycin resistance in enterococci causing nosocomial infections in Germany – 10 years of surveillance. **Antimicrobial Resistance and Infection Control**, 2018.

REN, Y., WANG, C., CHEN, Z., ALLAN, E., van der MEI, H.C., BUSSCHER, H.J. Emergent heterogeneous micro-environments in biofilms: substratum surface heterogeneity and bacterial adhesion force-sensing. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 42, p. 259-272, 2018.

ROY, R., TIWARI, M., DONELLI, G., TIWARI, V. Strategies for combating bacterial biofilms: A focus on anti-biofilm agents and their mechanisms of action. **Virulence**, v. 9(1), p. 522-554, 2018.

RŮŽIČKOVÁ, M., VITĚZOVÁ, M. e KUSHKEVYCHI, I. The characterization of *Enterococcus* genus: resistance mechanisms and inflammatory bowel disease. **Open medicine**, v. 15(1), p. 221-224, 2020.

SÁNCHEZ, E., MORALES, C. R., CASTILLO, S., LEOS-RIVAS, C., GARCÍA-BECERRA, L., MARTÍNEZ, D. M. O. Antibacterial and antibiofilm activity of methanolic plant extracts against nosocomial microorganisms. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2016, 2016.

SANHUEZA, L., MELO, R., MONTERO, R., MAISEY, K., MENDOZA, L., WILKENS, M. Synergistic interactions between phenolic compounds identified in grape pomace extract with antibiotics of different classes against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. **Plos One**, 2017.

SANTOS, N. D. Q. A resistência bacteriana no contexto da infecção hospitalar. **Texto & Contexto-Enfermagem**, v. 13, p. 64-70, 2004.

SATISH, S., RAGHAVENDRA, M. P., RAVEESHA, K. A. Evaluation of the antibacterial potential of some plants against human pathogenic bacteria. **Advances in Biological Research**, v. 2, p. 44-48, 2008.

SATPATHY, S., SEN, S.K., PATTANAIK, S., RAUT, S. Review of bacterial biofilm: an universal cause of contamination. **Biocatalysis and agricultural biotechnology**, 2016.

SCHLEIFER, K. H. e KILPPER-BÄLZ, R. Transfer of *Streptococcus faecalis* and *Streptococcus faecium* to the genus *Enterococcus* nom. rev. as *Enterococcus faecalis* comb. nov. and *Enterococcus faecium* comb. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 34(1), p. 31-34, 1984.

SENO, Y, KARIYAMA, R, MITSUHATA, R, MONDEN, K, KUMON, H. Clinical implications of biofilm formation by *Enterococcus faecalis* in the urinary tract. Okayama University Medical School 2005; 59:3, 79-87.

SHAFEEK, M. Y., EL-MALT, L. M., HAMEED, K. G. A., EL-ZAMKAN, M. A. Some virulence genes of pathogenic enterococci isolated from raw milk and some milk products. **International Journal of Veterinary Sciences**, v. 1(1), p. 102-113, 2018.

SIDDIQUI, M. F. et al. The efficacy of tannic acid in controlling biofouling by *Pseudomonas aeruginosa* is dependent on nutrient conditions and bacterial density. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 104, p. 74-82, 2015.

SILVA, L. N., ZIMMER, K. R., MACEDO, A. J., TRENTIN, D. S. Plant natural products targeting bacterial virulence factors. **Chemical review**, v. 116, p. 9162-9236, 2016.

SILVA, S., COSTA, E. M., HORTA, B., CALHAU, C., MORAIS, R. M., PINTADO, M. M. Anti-biofilm potential of phenolic acids: the influence of environmental pH and intrinsic physico-chemical properties. **Biofouling**, v. 32(8), p. 853-860, 2016.

SINGH, H., DAS, S., YADAV, J., SRIVASTAVA, V. K., JYOTI, A., KAUSHIK, S. In search of novel protein drug targets for treatment of *Enterococcus faecalis* infection. **Chem. Biol. Drug Des.**, v. 94, p. 1721-1739, 2019.

SLOBODNÍKOVÁ, L., FIALOVÁ, S., RENDEKOVÁ, K., KOVÁČ, J., MUCAJI, P. Antibiofilm activity of plant polyphenols. **Molecules**, v. 21, 2016.

SOARES, RO, FEDI, AC, REITER, KC, CAIERÃO, J, d'AZEVEDO, PA. Correlation between biofilm formation and *gelE*, *esp* and *agg* genes in *Enterococcus* spp. clinical isolates. **Virulence** 2014; 5:5, 634-637.

STEPANOVIC, S, VUKOVIC, D, HOLA, V, BONAVENTURA, GD, DJUKIC, S, CIRKOVIC, I, RUZICKA, F. Quantification of biofilm in microtiter plates: overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by *Staphylococci*. **APMIS** 2007; 115:8, 891-899.

STOODLEY, P., CARGO, R., RUPP, C.J., WILSON, S., KLAPPER, I. Biofilm material properties as related to shear-induced deformation and detachment phenomena. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 29, p. 361-367, 2002.

SUBRAMANI, R., JAYAPRAKASHVEL, M. Bacterial Quorum Sensing: Biofilm Formation, Survival Behaviour and Antibiotic Resistance. In: **Implication of Quorum Sensing and Biofilm Formation in Medicine, Agriculture and Food Industry**. Springer, Singapore, p. 21-37, 2019.

SUNDSFJORD, A., WILLEMS, R. Enterococcus research: recent developments and clinical challenges. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 16(6), p. 525-526, 2010.

TENDOLKAR, PM, BAGHDAYAN, AS, GILMORE, MS, SHANKAR, N. Enterococcal surface protein, Esp, enhances biofilm formation by *Enterococcus faecalis*. American Society for Microbiology 2004. <http://doi.org/10.1128/IAI.72.10.6032-6039.2004>.

THIERCELIN, M. E. e JOUHAUD, L. Reproduction de l'enterocoque; taches centrales; granulations peripheriques et microblastes. **Comptes Rendus des Seances de la Societe de Biologie Paris**, v. 55, p. 686-8, 1903.

THININA, A. C., KARIM, H., ALIA, M. M., KARIM, A. Evaluation and quantification of the inhibition of biofilm and planktonic forms of *Klebsiella pneumoniae* by the polyphenolic extract of *Pulicaria crispa*. **Journal of Advanced Pharmaceutical Technology & Research**, v. 11(3), p. 117, 2020

TIEN, BYQ, GOH, HMS, CHONG, KKL, BHADURI-TAGORE, S, HOLEC, S, DRESS, R, GINHOUX, F, INGERSOLL, MA, WILLIAMS, RBH, KLINE, KA. *Enterococcus faecalis* promotes innate immune suppression and polymicrobial catheter-associated urinary tract infection. *Infection and immunity* 2017; 85:12.

TOLEDO-ARANA, A. VALLE, J., SOLANO, C., ARRIZUBIETA, M. J., CUCARELLA, C., LAMATA, M., AMORENA, B., LEIVA, J., PENADÉS, J. R., LASA, I. The Enterococcal surface proteins, Esp, is involved in *Enterococcus faecalis* biofilm formation. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, n. 10, p. 4538-4545, 2001.

TORRES, C., ALONSONC. A., RUIZ-RIPA, L., LEÓN-SAMPEDRO, R., DEL CAMPO, R., COQUE, T. M. Antimicrobial resistance in *Enterococcus* spp. of animal origin. **Microbiology Spectrum**, v. 6, n. 4, 2018.

TRENTIN, D.S., GIODANI, R.B., MACEDO, A.J. Biofilmes bacterianos patogênicos: aspectos gerais, importância clínica e estratégias de combate. **Revista Liberato**, v. 14, p. 113-238, 2013.

TRENTIN, D.S.; SILVA, D.B.; FRASSON, A.P.; RZHEPISHEVSKA, O.; DA SILVA, M.V.; DE L PULCINI, E.; JAMES, G.; SOARES, G.V.; TASCA, T.; RAMSTEDT, M.; et al. Natural green coating inhibits adhesion of clinically important bacteria. **Sci. Rep.** v. 5, p. 82–87, 2015.

URQUHART, C., CASAGRANDE, C., FREITAS, L. DOS S., ZARZICKI, F., ALVES, C. F. DOS S. A., SANTOS, R. C. V. Atividade antibiofilme da cumarina frente à *Pseudomonas aeruginosa*. **Anais do 10º Salão Internacional de Ensino, Pesquisa e Extensão – SIEPE**. Universidade Federal do Pampa, 2018.

VIPIN, C., MUJEEBURAHIMAN, M., SAPTAMI, K., ARUN, A. B., REKHA, P. D. Synergistic interactions of quercetin with antibiotics against biofilm associated clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* in vitro. **bioRxiv**, 601336, 2019.

VIPIN, C., SAPTAMI, K., FIDA, F., MUJEEBURAHIMAN, M., RAO, S. S., ARUN, A. B., et al. Potential synergistic activity of quercetin with antibiotics against multidrug-resistant clinical strains of *Pseudomonas aeruginosa*. **PloS one**;15(11):e0241304, 2020.

VUONG, C., KOCIANOVA, S., VOYICH, J.M., YAO, Y., FISCHER, E.R., DELEO, F.R., OTTO, M. A crucial role for exopolysaccharide modification in bacterial biofilm formation,

immune evasion and virulence. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 279(52), p. 54881-54886, 2004.

WANG, S., YAO, J., ZHOU, B., YANG, J., CHAUDRY, M. T., WANG, M., et al. Bacteriostatic effect of quercetin as an antibiotic alternative in vivo and its antibacterial mechanism in vitro. **Journal of food protection** 2018;81(1):68-78.

WANG, J, CHANG, S, WANG, H, CHEN, P, SHIAU, Y, LAUDERDALE, T. High rates of multidrug resistance in *Enterococcus faecalis* and *E. faecium* isolated from inpatients and outpatients in Taiwan. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease** 2013; 75, 406-411.

WATNICK, P., KOLTER, R. Biofilm, city of microbes. **Journal of Bacteriology**, v. 182(10), p. 2675-2679, 2000.

WHITCHURCH, C.B., TOLKER-NIELSEN, T., RAGAS, P.C., MATTICK, J.S. Extracellular DNA required for bacterial biofilm formation. **Science Microbiology**, v. 295, p. 1487, 2002.

WIDYARMAN, A. S., CYNTHIA, E., THEODOREA, C. F., AMTHA, R. Antibiofilm activity of temu kunci (*Boesenbergia rotunda*), an Indonesian medicinal plant extract, against root canal pathogens. **Drug Invention Today**, v. 12, n. 11, 2019.

WU, X., HOU, S., ZHANG, Q., MA, Y., ZHANG, Y., KAN, W., ZHAO, X. Prevalence of virulence and resistance to antibiotics in pathogenic enterococci isolated from mastitic cows. **Journal of Veterinary Medical Science**, v. 78, n. 11, p. 1663-1668, 2016.

ZHENG, J., WU, Y. LIN, Z., PU, Z., YAO, W., CHEN, Z., LI, D., DENG, Q., QU, D., YU, Z. Characteristics of and virulence factors associated with biofilm formation in clinical *Enterococcus faecalis* isolated in China. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, article 2338, 2017.

ZHONG, Z., ZHANG, W., SONG, Y., LIU, W., XU, H., XI, X., MENGHE, B., ZHANG, H. e SUN, Z. Comparative genomic analysis of the genus *Enterococcus*. **Microbiological Research**, v. 196, p. 95-105, 2017.

APÊNDICE A - CAPÍTULO “CARACTERÍSTICAS E FORMAÇÃO DO BIOFILME BACTERIANO” PUBLICADO NO LIVRO INTERNACIONAL SAÚDE ÚNICA, 2020.



Características e formação do biofilme bacteriano

Marília Martins Manta ¹, Rafael Artur de Q. C. de Sá ¹, Aparecido Jonathan Mandú de Araújo ¹, Tainara Fernandes Dantas ¹, Viviane Ramos Bandeira ², Marcos Aurélio Santos da Costa ¹, Bárbara de Azevedo Ramos ³, Túlio Diego da Silva ⁴, Maria Tereza dos Santos Correia ¹

¹ Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Pernambuco (UFPE)
(manta.marilia@gmail.com)

² Centro Universitário Brasileiro (UNIBRA)

³ Departamento de Antibióticos, Universidade Federal de Pernambuco

³ Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste (CETENE)

Resumo

O biofilme é uma forma de vida bacteriana bastante preocupante para a saúde humana. É formado nas mais diversas condições e ambientes, e são responsáveis por números elevados de infecções bacterianas de difícil tratamento. Seu mecanismo de formação é complexo, e envolve quatro etapas, onde no fim, tem uma estrutura bem arquitetada e resistente, com presença de canais para a circulação de compostos e nutrientes, produção de substâncias e a formação de um ambiente favorável para os organismos de seu interior. Devido a sua estrutura, onde possui uma matriz exopolissacarídica que envolve as bactérias, é mais resistente ao tratamento com

antibióticos e ao mecanismo de defesa do organismo. Sendo assim, infecções causadas por bactérias formadoras de biofilme costumam ser mais agressivas e duradouras.

Palavras-chave: Biofilme, Bactéria, Resistência.

Área Temática: Saúde Coletiva.

1 INTRODUÇÃO

Bactérias podem viver de forma livre (planctônica) ou podem, em algum momento, se aderirem à uma superfície, onde passam a serem chamadas de sésseis. Antigamente se achava que as bactérias eram preferencialmente encontradas na forma planctônica, porém, hoje em dia já se sabe que as bactérias têm preferência em se aderir a uma superfície e formar agregados. Essas bactérias aderidas de forma irreversível ao substrato e rodeadas de material exopolissacarídico, formarão o biofilme (TRENTIN et al., 2013; HENRIQUES et al., 2013).

O biofilme está presente na maioria das infecções bacterianas e, em sua maioria, as infecções causadas por esse modo de vida são mais difíceis de erradicar. Isso porque o biofilme possui características que tornam a bactéria mais resistente à tratamentos e defesas e também mais virulenta para o hospedeiro (MAH, 2012; TRENTIN, 2013).

Essa forma de vida vem trazendo desafios para o tratamento de infecções bacterianas e, devido a isso, vários estudos estão sendo feitos visando ter maior conhecimento sobre toda a estrutura do biofilme e como se dá sua formação, assim como meios de impedir que se forme ou de destruí-los.

2 METODOLOGIA

Revisão bibliográfica onde foi realizada uma busca por artigos nas principais plataformas científicas, como PubMed (NCBI), Science Direct, SciELO e Portal da Capes. Os descritores utilizados foram: biofilm, bacterial biofilm, bacterial resistance e virulence.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Segundo Costerton et al. (1999), biofilme é definido como “uma comunidade estruturada de células bacterianas cobertas por uma matriz polimérica autoproduzida e

aderentes a uma superfície inerte ou viva”. Pode ser desenvolvido em superfícies bióticas ou abióticas, e ser composto por uma única espécie ou por diversas espécies diferentes vivendo em comunidade, estando o primeiro mais presente em infecções e em dispositivos médicos, e o segundo presente nos mais variados ambientes. Há diversos mecanismos distintos que pode levar uma bactéria planctônica a se aderir a uma superfície, havendo influência tanto de fatores ambientais como de fatores genéticos (PRATT E KOLTER, 1999; O’TOOLE et al., 2000; SATPHATY et al., 2016).

De um modo geral, a formação do biofilme possui quatro estágios básicos: uma adesão inicial, formação da microcolônia, maturação do biofilme e dispersão. Na primeira etapa, ocorre a adesão das células planctônicas ao substrato. Essa adesão inicial sofre influência de fatores físico-químicos como características da superfície celular, movimento dos flagelos, presença de genes e ação de forças de adesão, como van der Waals, interações eletrostáticas e forças hidrodinâmicas (DONLAN, 2002; STOODLEY et al., 2002; FLEMMING et al., 2016; REN et al., 2018; CH’NG et al., 2019).

Com a adesão, as bactérias passam a se comunicar por meio de um mecanismo conhecido como *Quorum sensing*. Nele, as bactérias que estão agora em maior proximidade uma das outras, secretam compostos metabólicos que funcionam como sinalizadores e reguladores, induzindo a expressão de genes que serão responsáveis pela produção da matriz polissacarídica e que regulam a formação do próprio biofilme (STOODLEY et al., 2002; DAVIES, 2003).

Na segunda etapa da formação do biofilme, as bactérias começam a se multiplicar, formando as microcolônias. A matriz, que é chamada de substância extracelular polimérica (EPS do inglês *exopolysaccharide substance*), é produzida nesta etapa. A EPS tem um papel muito importante na estabilidade do biofilme e na defesa contra a resposta imunológica e contra antimicrobianos. Ela vai preencher os espaços entre as células bacterianas no biofilme, determinando a sua arquitetura e imobilizando as células, mantendo-as em maior proximidade e permitindo que haja interação e comunicação entre elas (WHITCHURCH et al., 2002; VUONG et al., 2004; FLEMMING E WINGENDER, 2010; FLEMMING et al., 2016; SATPATHY et al., 2016; CH’NG et al., 2019).

O crescimento do biofilme e a maturação ocorre também por meio do *Quorum sensing*, que leva a um aumento na expressão de componentes, como DNA extracelular, polissacarídeos e proteases extracelulares. A partir do momento que a densidade bacteriana dentro do biofilme vai aumentando, vão se formando estruturas que permitem a sobrevivência dos microrganismos

na comunidade, como canais na matriz, que permitem a entrada de nutrientes e água e também a saída de metabólitos tóxicos produzidos pelas bactérias (KOLTER E LOSICK, 1998; CH'NG et al., 2019).

A última fase da formação do biofilme é a dispersão, onde ocorre liberação de bactérias do biofilme. Essa dispersão é estimulada por diversos fatores como a redução de nutrientes disponíveis devido ao aumento da densidade bacteriana no biofilme, onde bactérias se dispersam da comunidade para buscar ambientes mais ricos em nutrientes. Estudos também indicam dispersão a partir do remodelamento da matriz, um processo que ocorre como forma de adaptação dessa estrutura a alterações no meio. Esta última etapa é de fundamental importância para a manutenção do biofilme, visto que evita que o estoque de nutrientes esgote e as bactérias e toda a estrutura possam ficar fragilizadas. A bactéria que estava até então na forma séssil, volta ao estado planctônico, podendo voltar a se aderir em algum momento e reiniciar o ciclo (WATNICK E KOLTER, 2000; STOODLEY et al., 2002; FLEMMING et al., 2016).

As bactérias que estão presentes no biofilme possuem algumas características que as tornam mais difíceis de erradicar. A matriz, por exemplo, funciona como uma barreira física para proteção contra o sistema imune e para a entrada de antibióticos, de forma que as bactérias conseguem resistir a concentrações até mil vezes maiores da substância. Além disso, as células dentro do biofilme não possuem taxa de crescimento sincronizada, fazendo com que dentro de um mesmo biofilme exista células dormentes e em fases diferentes do ciclo celular, sendo algumas insensíveis a muitos antimicrobianos, principalmente àqueles que agem na multiplicação bacteriana (DONLAN, 2002; STOODLEY et al., 2002; DAVIES, 2003; MOHAMED AND HUANG, 2007; FLEMMING AND WINGENDER, 2010; DEL POZO, 2017).

Além do biofilme estar presente na maioria das infecções bacterianas, está relacionado também com a colonização de dispositivos médicos, como cateteres urinários, venosos e arteriais, respiradores e implantes artificiais. As bactérias dentro de um biofilme podem contribuir tanto para a fase crônica da doença, onde é mais difícil de erradicar, quanto para a fase infecciosa, a partir da dispersão das bactérias do biofilme, que podem causar novas infecções. Células presentes nessa estrutura também possuem maior facilidade de adquirir elementos genéticos transmissíveis, o que acaba facilitando a aquisição de genes de resistência à antibióticos e de virulência. Sendo assim, essa estrutura está relacionada a uma maior sobrevivência do microrganismo e, conseqüentemente, a uma maior patogenicidade

(WATNICK E KOLTER, 2000; DONLAN, 2002; DAVIES, 2003; REISNER et al., 2006; MAH, 2012; TRENTIN, 2013).

Estima-se que os biofilmes estejam presentes em cerca de 65% das infecções nosocomiais. Com base no conhecimento dos perigos dessa forma de vida à saúde humana, o biofilme vem sendo bastante estudado nos últimos anos, onde procura-se entender melhor sua estrutura e os processos de seu desenvolvimento, buscando também compostos antibiofilme, que inibam sua formação ou que consiga degradar a estrutura, podendo tornar as infecções bacterianas mais fáceis de erradicar (SATPATHY et al., 2016)

4 CONCLUSÃO

O biofilme já é conhecido há anos, mas, mesmo com diversos estudos na literatura, ainda não se tem conhecimento total sobre todos os mecanismos relacionados à sua formação. Muito precisa ser descoberto, principalmente sobre mecanismos moleculares e alterações nas expressões proteicas que ocorrem quando a bactéria está mudando do estado planctônico para o sésil.

Mas pode-se afirmar que o biofilme possui uma estrutura bastante complexa e dinâmica, e que funciona como um mecanismo tanto de virulência quanto de resistência para as bactérias residentes. Dessa forma, bactérias formadoras de biofilme costumam ser mais patogênicas, e as infecções causadas por elas são mais complexas de se tratar.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

CH'NG, J., CHONG, K. K. L., LAM, L. N., WONG, J. J. e KLINE, K. A. Biofilm-associated infection by enterococci. **Nature Reviews Microbiology**, v. 17, p. 82-94, 2019.

COSTERTON, J.W., STEWART, P.S., GREENBERG, E.P. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. **Microbes, Immunity and Disease**, v. 284, p. 1318-1322, 1999.

DAVIES, D. Understanding biofilm resistance to antibacterial agents. **Nature reviews Drug discovery**, v. 2 (2), p. 114-122, 2003.

DEL POZO, J.L. Biofilm-related disease. **Expert Review of Anti-infective Therapy**, DOI: 10.1080/14787210.2018.1417036, 2017.

- DONLAN, R.M. Biofilms: microbial life on surfaces. **Emerging Infectious Diseases**, v. 8(9), p. 881-890, 2002.
- FLEMMING, H., WINGENDER, J. The biofilm matrix. **Nature reviews: Microbiology**, v. 8, p. 623-633, 2010.
- FLEMMING, H., WINGENDER, J., SZEWZYK, U. STEINBERG, P., RICE, S.A., KJELLEBERG, S. Biofilms: an emergent form of bacterial life. **Nature reviews: Microbiology**, v. 16, p.563-575, 2016.
- KOLTER, R., LOSICK, R. One for all and all for one. **Microbiology**, v. 280, p. 226-227, 1998.
- HENRIQUES, A., VASCONCELOS, C., CERCA, N. A importância dos biofilmes nas infecções nosocomiais – O estado da arte. **Arquivos de Medicina**, v. 27, p. 27-36, 2013.
- MAH, T. Biofilm-specific antibiotic resistance. **Future microbiology**, v. 9, p. 1061-1072, 2012.
- MOHAMED, Jamal A., HUANG, David B. Biofilm formation by enterococci. **Journal of medical microbiology**, v. 56, n. 12, p. 1581-1588, 2007.
- O'TOOLE, G., KAPLAN, H. B., KOLTER, R. Biofilm formation as microbial development. **Annu. Rev. Microbiol.**, v. 54, p. 49-79, 2000.
- PRATT, L.A., KOLTER, R. Genetic analyses of bacterial biofilm formation. **Current opinion in microbiology**, v. 2(6), p. 598-603, 1999.
- REISNER, A., KROGFELT, K. A., KLEIN, B. M., ZECHNER, E. L., MOLIN, S. In vitro biofilm formation of commensal and pathogenic *Escherichia coli* strains: impact of environmental and genetic factor. **Journal of bacteriology**, p. 3572-3581, 2006.
- REN, Y., WANG, C., CHEN, Z., ALLAN, E., van der MEI, H.C., BUSSCHER, H.J. Emergent heterogeneous micro-environments in biofilms: substratum surface heterogeneity and bacterial adhesion force-sensing. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 42, p. 259-272, 2018.
- SATPATHY, S., SEN, S.K., PATTANAIK, S., RAUT, S. Review of bacterial biofilm: an universal cause of contamination. **Biocatalysis and agricultural biotechnology**, 2016.
- STOODLEY, P., CARGO, R., RUPP, C.J., WILSON, S., KLAPPER, I. Biofilm material properties as related to shear-induced deformation and detachment phenomena. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 29, p. 361-367, 2002.

TRENTIN, D.S., GIODANI, R.B., MACEDO, A.J. Biofilmes bacterianos patogênicos: aspectos gerais, importância clínica e estratégias de combate. **Revista Liberato**, v. 14, p. 113-238, 2013.

VUONG, C., KOCIANOVA, S., VOYICH, J.M., YAO, Y., FISCHER, E.R., DELEO, F.R., OTTO, M. A crucial role for exopolysaccharide modification in bacterial biofilm formation, immune evasion and virulence. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 279(52), p. 54881-54886, 2004.

WATNICK, P., KOLTER, R. Biofilm, city of microbes. **Journal of Bacteriology**, v. 182(10), p. 2675-2679, 2000.

WHITCHURCH, C.B., TOLKER-NIELSEN, T., RAGAS, P.C., MATTICK, J.S. Extracellular DNA required for bacterial biofilm formation. **Science Microbiology**, v. 295, p. 1487, 2002.

APÊNDICE B – CAPÍTULO “*Enterococcus faecalis*: A ESPÉCIE MAIS VIRULENTA DO GÊNERO” PUBLICADO NO LIVRO INOVAÇÕES EM SAÚDE, 2020.



CAPÍTULO 1

Enterococcus faecalis: A ESPÉCIE MAIS VIRULENTA DO GÊNERO

Marília Martins Manta ¹

Tainara Fernandes Dantas ²

Rafael Artur de Queiroz Cavalcanti de Sá ³

Túlio Diego da Silva ⁴

Maria Tereza dos Santos Correia ⁵

Bárbara de Azevedo Ramos ⁶

¹ Mestranda do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Fisiologia, UFPE; ² Graduanda em Bacharelado em Ciências Biológicas, UFPE; ³ Mestre pelo Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Fisiologia, UFPE; ⁴ Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste (CETENE); ⁵ Professora orientadora da UFPE; ⁶ Pós-Doutoranda pelo RENORBIO, UFPE.

manta.marilia@gmail.com

RESUMO: Microrganismos estão presentes nos mais diversos ambientes e possuem características específicas que os tornam difíceis de eliminar de determinados locais. Os hospitais, por exemplo, são grandes focos de infecções bacterianas, com a presença de alguns gêneros patogênicos, que devido a aquisição de resistência, causam infecções que são difíceis de tratar. O gênero *Enterococcus* possui algumas características que o torna mais virulento e cada vez mais resistente aos antibióticos utilizados na clínica, e por isso são responsáveis por infecções difíceis de erradicar. As bactérias pertencentes a este gênero são cocos Gram-positivos que conseguem viver em condições distintas de temperatura e pH e são capazes de realizar transferência de genes entre si. Entre várias espécies deste gênero a *Enterococcus faecalis* está como umas das mais presentes em infecções enterocócicas. Devido ao cenário mundial do aumento de infecções bacterianas e a dificuldade cada vez maior de tratar essas infecções, é importante um maior conhecimento das características patogênicas desses microrganismos, para assim ser possível buscar meios alternativos de erradicá-los.

Palavras-chave: Bactérias. Gram-positiva. Virulência.

INTRODUÇÃO

Segundo Wang et al. (2018), o trato gastrointestinal humano é colonizado por praticamente 10^{14} bactérias distintas que vivem em equilíbrio. Porém, a quebra deste equilíbrio pode ser perigosa ao corpo humano, causando infecções graves.

Algumas bactérias possuem características que as tornam mais difíceis de eliminar, estando presente nos mais diversos ambientes. Os hospitais, por exemplo, são grandes focos de infecções bacterianas. Por isso o número crescente de Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde (IRAS) se tornou preocupante, e se ampliou a quantidade de estudos voltados para entender sobre as características das principais bactérias patogênicas.

Um dos gêneros que mais vem preocupando devido ao aumento do número de casos de IRAS nos últimos anos é o *Enterococcus*, que é o segundo Gram-positivo mais frequente em infecções nas Unidades de Tratamento Intensivo (UTIs) (ANVISA, 2020). Sendo assim, esse trabalho busca coletar dados sobre características gerais do gênero *Enterococcus* e mais especificamente da *Enterococcus faecalis*, no qual representa uma das espécies com maiores características de virulência que estão relacionadas as infecções hospitalares.

MATERIAL E MÉTODOS

Trata-se de uma revisão bibliográfica no qual foi realizada uma busca por diversos artigos nas principais plataformas científicas como, PubMed (NCBI), Science Direct, SciELO e Portal da Capes. Os descritores utilizados foram: *Enterococcus*, *Enterococcus faecalis*, virulência e biofilme. E utilizado como filtro para publicações entre os anos de 2016-2020. Foram excluídos artigos que não se referiam ao gênero ou a espécie bacteriana de interesse, assim como aqueles no qual a temática estava fora do tema desta revisão.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

1. O gênero *Enterococcus*

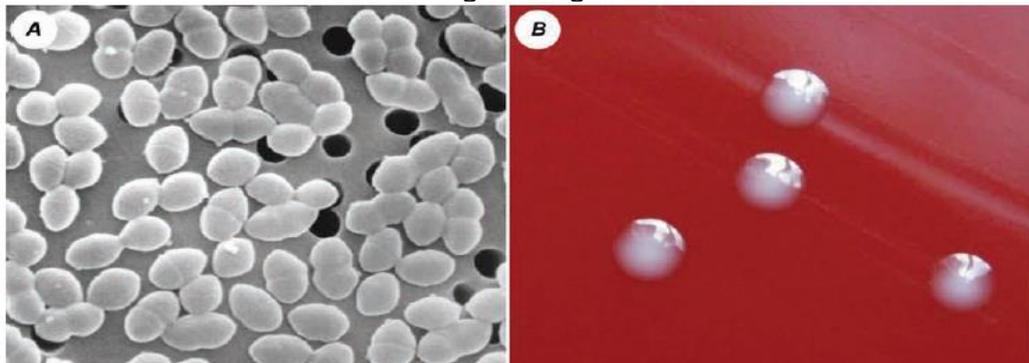
Enterococcus já tinha sido relatado desde os anos 1900. Porém, na época consideravam-no pertencente ao gênero *Streptococcus* devido principalmente às similaridades morfológicas e bioquímicas, sendo classificados como *Streptococcus* do grupo D. Thiercelin & Jouhaud (1903) citaram *Enterococcus* como um gênero distinto, mas seu estudo não foi muito aceito na época. Em um estudo de Schleifer & Klipper-Balz (1984) eles descobriram, por meio de hibridização DNA-DNA e sequenciamento do 16S rRNA, que as espécies até então conhecidas como *Streptococcus faecium* e *Streptococcus faecalis* eram distintas das outras espécies deste gênero, a partir disso foram então classificadas, de fato, como *Enterococcus faecium* e *Enterococcus faecalis*. Só após este estudo, essas espécies foram reconhecidas como um gênero diferente (Zhong et al., 2017; García-Solache & Rice, 2019; Růžičkova et al., 2020).

Nos dias atuais, este gênero já é bastante aceito e estudado. Foram descobertas várias espécies pertencentes a ele, com números variando de 36 a 58 espécies (García-Solache & Rice, 2019; Růžičkova et al., 2020). Bactérias classificadas como *Enterococcus* spp. são cocos Gram-positivos não esporulados, anaeróbicas facultativas, podendo se apresentar em cadeias ou isoladas. Suas colônias são esbranquiçadas quando crescidas em meio tradicionais, mas algumas

espécies podem apresentar coloração da colônia mais amarelada. A maioria das espécies não são móveis, com exceção de *E. gallinarum* e *E. casseliflavus*. Quanto à classificação bioquímica são bactérias ácido-lático positivas, catalase negativo, com crescimento em NaCl 6,5%, hidrólise da bile esculina e PYR positivo. Podem crescer em temperatura variando de 10 a 45 °C, porém sua temperatura ótima é de 35 °C (Figueredo et al., 2016; García-Solache & Rice, 2019).

Podem ser encontradas em animais, plantas, solo e água. Nos humanos, fazem parte da microbiota principalmente do trato gastrointestinal. No entanto, são considerados organismos oportunistas, e podem vir a causar infecções no trato urinário, em feridas cirúrgicas, bacteremia, endocardite e infecções em cateter e outros dispositivos médicos. As espécies *E. faecalis* e *E. faecium* são as responsáveis pelas principais infecções enterocócicas, estando presentes em 80% delas (Zhong et al., 2017; Torres et al, 2018; García-Solache & Rice, 2019; Růžickova et al., 2020).

Figura 1: (A) Células enterocócicas, visualizadas por meio de uma microscopia eletrônica. (B) Colônias de *E. faecalis* crescidas por 24 horas a 37 °C em meio ágar sangue.



Fonte: Růžickova et al. (2020).

Mesmo estando presente de forma natural em diversos ambientes, como mencionado, espécies desse gênero vem se tornando alvo de estudos devido à preocupação com o aumento de infecções, principalmente pelo fato de enterococos já serem considerados o segundo maior gênero causador de infecções nosocomiais dentre os Gram-positivos. E o que se tornou mais alarmante foi a capacidade de algumas espécies de adquirir resistência a antibióticos utilizados na clínica, tornando as infecções mais difíceis de tratar (Guzman Pietro et al., 2016; Figueredo et al., 2016; Remschmidt et al., 2018; ANVISA, 2019; Růžickova et al., 2020).

Enterococos possuem algumas características que os tornam mais capazes de resistir a antibióticos e os tornam mais virulentos. Intrinsecamente, o gênero possui resistência a alguns antibióticos, além da capacidade de adquirir resistência a novos antimicrobianos. Resistência intrínseca é uma característica que já está presente no genoma, e a grande maioria das cepas a possuem. *Enterococcus* spp. possuem resistência intrínseca à β -lactâmicos, cefalosporina e níveis baixos de resistência a aminoglicosídeos e clindamicina (Guzman Prieto et al., 2016; Heidari et al., 2016; García-Solache & Rice, 2019; Růžickova et al., 2020).

Já a resistência adquirida, pode ocorrer principalmente por mutação ou troca de material genético, muitas vezes estimulado por uma necessidade de sobrevivência bacteriana. Uso indiscriminado de antibióticos, pacientes que não terminam corretamente a antibioticoterapia, prescrição de doses insuficientes do antibiótico e a presença de bactérias no ambiente hospitalar podem estimular a aquisição de resistência (Figueredo et al., 2016; Růžickova et al., 2020). A troca do material genético se dá principalmente por meio de plasmídeos ou de transposons. Já foi reportado a aquisição de resistência a algumas classes, como glicopeptídeos, aminoglicosídeos, fluoroquinolonas, linezolida, daptomicina e tetraciclina (Cavaco et al., 2016; Heidari et al., 2016; Torres et al., 2018; Gárcia-Solache & Rice, 2019).

Segundo Růžickova et al. (2020) virulência, ou patogenicidade das cepas, está representada por transmissibilidade, toxicidade e invasividade. Ainda segundo os autores, cepas que vivem no ambiente são menos virulentas, essa virulência pode ser aumentada nos isolados de acordo com os processos de seleção natural já citados. Os fatores de virulência mais conhecidos e que estão presentes em espécies do gênero *Enterococcus* são: a presença de substâncias de agregação, presença de proteínas que aumentam a patogenicidade (como a proteína de ligação ao colágeno e proteínas de superfície), capacidade de adesão às células do hospedeiro e de invasão de tecidos, a habilidade de invadir o sistema imune e a capacidade de formar biofilmes.

Já foi observado a formação de biofilme de enterococos em infecções do trato urinário, em feridas, no trato gastrointestinal e na endocardite. A presença do biofilme torna a infecção mais difícil de tratar, assim como serve como ponto de disseminação bacteriana. As principais espécies de *Enterococcus* que formam biofilme e causam infecções são *E. faecalis* e *E. faecium*. (Holmberg & Rasmussen, 2016; ChajECKa-Wierzchowska et al., 2017; Ch'ng et al., 2019; Gárcia-Solache & Rice, 2019).

Assim como os genes de resistência, os fatores de virulência também conseguem ser transferidos entre os microrganismos. Dessa forma, cepas que possuem esses fatores causam infecções mais severas do que cepas que não os possuem. Diversos estudos já foram realizados com a intenção de identificar a presença de genes de virulência em *Enterococcus* spp., como o *esp* (proteína de superfície enterocócica), *gelE* (gelatinase), *ccf* (feromônio sexual), *cylA* (componente ativador da citolisina A), *ace* (proteína de ligação ao colágeno), *asa1* (substância de agregação), entre outros. (Wu et al., 2016; Heidari et al., 2016; ChajECKa-Wierzchowska et al., 2017; Shafeek et al., 2018).

1.1. ***Enterococcus faecalis***

Enterococcus faecalis é encontrada principalmente no intestino de humanos e de animais, sendo também comumente encontrada no ambiente. Mas, assim como outras espécies de seu gênero, ela tem capacidade de se tornar patogenica. Das espécies do gênero *Enterococcus*, *E. faecium* e *E. faecalis* são responsáveis pela maioria das infecções enterocócicas. Dentre elas, a mais prevalente em infecções é a *E. faecalis*, encontrada em aproximadamente 70% das infecções enterocócicas. Apesar de *E. faecium* possuir mais resistência aos antibióticos utilizados na clínica, *E.*

faecalis é mais virulenta, e possui uma maior capacidade de formar biofilme, o que torna suas infecções difíceis de tratar (Heidari et al., 2016; Guzmán Prieto et al., 2016; Beganovic et al., 2018; García-Solache & Rice, 2019).

Essa espécie possui grande capacidade de viver em ambientes hostis, com temperaturas variando de 5 a 65 °C e pH entre 4,6 e 9, e à altas concentrações de sais. Utiliza principalmente a glicose como fonte de energia, e tem como produto final o ácido láctico (Barros, 2014; Singh et al., 2019).

O aumento de infecções causadas por esta espécie ocorre principalmente devido a sua plasticidade genômica e pela capacidade de evolução, onde ocorre transferência de genes, principalmente por meio de plasmídeos e transposons. Devido à alta capacidade de aquisição de resistência, hoje em dia estudos já relataram a presença de isolados de *E. faecalis* multidroga resistente (MDR) e extensivamente resistente (XDR). Dessa forma, a espécie consegue adquirir cada vez mais genes de resistência à antibióticos e de virulência, se tornando um problema emergente de saúde (Lebreton et al., 2017; Hirt et al., 2018; Singh et al., 2019).

Mesmo *E. faecium* tendo adquirido resistência a um maior número de antibióticos, estudos mostram que isolados de *E. faecalis* possuem uma maior capacidade de aderir a superfícies e formar biofilmes, sendo uma característica importante dessa espécie, por dificultar o tratamento de suas infecções. Essa capacidade *in vivo*, tem sido bastante relacionada com a presença de alguns fatores de virulência, que são características presentes na bactéria e utilizadas para o microrganismo conseguir colonizar e invadir o tecido do hospedeiro, permitindo que escape do sistema imunológico. Isolados clínicos que apresentam um ou um conjunto de fatores de virulência tendem a ter um fenótipo mais patogênico e causar infecções mais severas. (Zheng et al., 2017; Ch'ng et al., 2019). Abaixo estão descritos alguns dos principais fatores de virulência presentes em *E. faecalis*:

- **Substâncias agregadoras:** São adesinas codificadas pelos genes *asp1*, *asc10* e *asa1*, que permitem a ligação das células bacterianas durante a conjugação, formando agregados e facilitando a troca de material genético entre elas. Dessa forma, facilita a propagação de diversos plasmídeos entre as espécies (ChajECKa-Wierzchowska et al., 2017; Madsen et al., 2017).
- **Proteína de superfície de *Enterococcus* (Esp):** Codificada pelo gene *esp*, essa proteína atua como uma adesina, contribuindo com a colonização e persistência da bactéria, principalmente no trato urinário. Além disso, segundo alguns autores, essa proteína tem influência na formação de biofilme de *E. faecalis* (Zheng et al., 2017; ChajECKa-Wierzchowska et al., 2017).
- **Citolisinas:** São exotoxinas que atuam principalmente lisando a membrana das células, sendo tóxica para eritrócitos, algumas bactérias Gram-negativas e outras células eucarióticas (ChajECKa-Wierzchowska et al., 2017; Zheng et al., 2017).
- **Proteína ligadora do colágeno (Ace):** Codificada pelo gene *ace*, é uma adesina presente na parede celular que facilita a ligação de *E. faecalis* ao colágeno e tem função antigênica nas infecções causadas por essa espécie. Também tem capacidade de se ligar a proteínas da matriz extracelular, tendo papel importante

na colonização bacteriana (Madsen et al., 2017; ChajECKA-Wierzchowska et al., 2017).

- Gelatinase: codificada pelo gene *ge/E*, é uma metaloprotease extracelular capaz de hidrolisar colágeno, fibrinogênio, caseína, hemoglobina, insulina e outros peptídeos (Guneser e Eldeniz, 2016; Madsen et al., 2017).
- Formação de biofilme: Biofilme é um agregado de bactérias aderidos a uma superfície e envoltas por uma matriz polissacarídica. Essa estruturada funciona como um mecanismo de virulência bacteriano, visto que a produção da matriz impede a ação dos antimicrobianos e funciona como uma defesa para as bactérias contra o ataque do sistema imunológico do hospedeiro (Satpathy et al., 2016; Madsen et al., 2017).
- Pili associado a biofilme e endocardite (Ebp): São estruturas filamentosas presentes na superfície bacteriana que contribuem para a formação de biofilme, aderência em superfícies abióticas e em colágeno e fibrinogênio em *E. faecalis*. Além disso, tem ação imunogênica contra o sistema imune humano (La Rosa et al., 2016; Madsen et al., 2017).

CONCLUSÕES

Com os dados coletados é possível observar o quanto infecções enterocócicas vêm se tornando cada vez mais perigosas, principalmente devido à aquisição de resistência e a uma virulência cada vez maior do microrganismo. Os fatores de virulência somados a aquisição de mecanismos de resistência na espécie *E. faecalis*, mostra o porquê deste gênero ser cada vez mais estudado e estar cada vez mais presente em ambientes e infecções hospitalares severas e de difícil tratamento.

REFERÊNCIAS

ANVISA (2019). Controle de infecção hospitalar: balanço e reflexões. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/noticias>

ANVISA (2020). Boletim Segurança do Paciente e Qualidade em Serviços de Saúde nº 20. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Disponível em: <https://www20.anvisa.gov.br/segurancadopaciente/index.php/publicacoes>

BEGANOVIC, M. et al. A review of combination antimicrobial therapy for *Enterococcus faecalis* bloodstream infections and infective endocarditis. *Reviews of anti-infective agents*, v. 67, n. 2., p. 303-309, 2018.

CAVACO, L. M. et al. Detection of linezolid resistance due to the *optrA* gene in *Enterococcus faecalis* from poultry meat from the American continent (Colombia). *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2016.

CH'NG, J. et al. Biofilm-associated infection by enterococci. *Nature Reviews Microbiology*, v. 17, p. 82-94, 2019.

CHAJECKA-WIERZCHOWSKA, W. et al. Virulence factors of *Enterococcus* spp. presented in food. *LWT – Food, Science and Technology*, v. 75, p. 670-676, 2017.

FIGUEREDO, R. A. M. et al. *Enterococcus* resistente à vancomicina: uma preocupação em expansão no ambiente hospitalar. *Journal of Infection Control*, v. 6(1), p. 11-15, 2016.

GARCÍA-SOLACHE, M.; RICE, L. B. The *Enterococcus*: a model of adaptability to its environment. *Clinical Microbiology Reviews*, v. 32(2), p. e00058-18, 2019.

GUZMAN PIETRO, A. M. et al. Global emergence and dissemination of enterococci as nosocomial pathogens: attack of the clones?. *Frontiers in Microbiology*, v. 7, 2016.

GUNESER, M. B., ELDENIZ, A. U. The effect of gelatinase production of *Enterococcus faecalis* on adhesion to dentin after irrigation with various endodontic irrigants. *Journal Acta Biomaterialia Odontologica Scandinavica*, v. 2(1), p. 144-149, 2016.

HEIDARI, H. et al. Virulence factors, antimicrobial resistance pattern and molecular analysis of *Enterococcal* strains isolated from burn patients. *Microbial Pathogenesis*, v. 90, p. 93-97, 2016.

HIRT, H. et al. *Enterococcus faecalis* sex pheromone cCF10 enhances conjugative plasmid transfer in vivo. *mBio* 9:e00037-18. <https://doi.org/10.1128/mBio.00037-18>.

HOLMBERG, A.; RASMUSSEN, M. Mature biofilms of *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* are highly to antibiotics. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, v. 84, p. 19-21, 2016.

LA ROSA, S. L. et al. *Enterococcus faecalis* Ebp pili are importante for cell-cell aggregation and intraspecies gene transfer. *Microbiology*, v. 162, p. 798-802, 2016.

LEBRETON, F. et al. Tracing the *Enterococci* from paleozoic origins to the hospital. *Cell*, v. 169, p. 849-861, 2017.

MADSEN, K. T. et al. Virulence factors associated with *Enterococcus faecalis* infective endocarditis: a mini review. *The Open Microbiology Journal*, v. 11, p. 1-11, 2017.

REMSCHMIDT, C. et al. Continuous increase of vacomycin resistance in enterococci causing nosocomial infections in Germany – 10 years of surveillance. *Antimicrobial Resistance and Infection Control*, 2018.

RŮŽIČKOVA, M., VITĚZOVA, M.; KUSHKEVYCHI, I. The characterization of Enterococcus genus: resistance mechanisms and inflammatory bowel disease. *Open medicine*, v. 15(1), p. 221-224, 2020.

SATPATHY, S. et al. Review on bacterial biofilm: An universal causa of contamination. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, v. 7, p. 56-66, 2016.

SCHLEIFER, K. H.; KILPPER-BÄLZ, R. Transfer of Streptococcus faecalis and Streptococcus faecium to the genus Enterococcus nom. rev. as Enterococcus faecalis comb. nov. and Enterococcus faecium comb. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v. 34(1), p. 31-34, 1984.

SHAFEEK, M. Y. et al. Some virulence genes of pathogenic enterococci isolated from raw milk and some milk products. *International Journal of Veterinary Sciences*, v. 1(1), p. 102-113, 2018.

SILVA, S. et al. Anti-biofilm potential of phenolic acids: the influence of environmental pH and intrinsic physico-chemical properties. *Biofouling*, v. 32, n. 8, p. 853-860, 2016.

SINGH, H. et al. In search of novel protein drug targets for treatment of Enterococcus faecalis infection. *Chem. Biol. Drug Des.*, v. 94, p. 1721-1739, 2019.

SLOBODNÍKOVÁ, L. et al. Antibiofilm activity of plant polyphenols. *Molecules*, v. 21, 1717, 2016.

THIERCELIN, M. E.; JOUHAUD, L. Reproduction de l'enterocoque; taches centrales; granulations peripheriques et microblastes. *Comptes Rendus des Seances de la Societe de Biologie Paris*, v. 55, p. 686-8, 1903.

TORRES, C. et al. Antimicrobial resistance in Enterococcus spp. of animal origin. *Microbiology Spectrum*, v. 6, n. 4, 2018.

WANG, H. et al. Good or bad: gut bacteria in human health deseases. *Journal Biotechnology & Biotechnological Equipment*, v. 32, p. 1075-1080, 2018.

WU, X. et al. Prevalence of virulence and resistance to antibiotics in pathogenic enterococci isolated from mastitic cows. *Journal of Veterinary Medical Science*, v. 78, n. 11, p. 1663-1668, 2016.

ZHENG, J. et al. Characteristics of and virulence factors associated with biofilm formation in clinical Enterococcus faecalis isolated in China. *Frontiers in Microbiology*, v. 8, article 2338, 2017.

ZHONG, Z.et al. Comparative genomic analysis of the genus *Enterococcus*.
Microbiological Research, v. 196, p. 95-105, 2017.

APÊNDICE C – CAPÍTULO “COMPOSTOS FENÓLICOS NA INIBIÇÃO DO BIOFILME BACTERIANO” PUBLICADO NO LIVRO FATORES DE VIRULÊNCIA MICROBIANOS E TERAPIAS EMERGENTES, 2020.

CAPÍTULO 17

COMPOSTOS FENÓLICOS NA INIBIÇÃO DO BIOFILME BACTERIANO

Martins Marília Manta

Graduada em Biomedicina pela Universidade Federal de Pernambuco-UFPE Instituição: Universidade Federal de Pernambuco
Endereço: Av. Prof. Moraes Rego, 1235- Cidade Universitária, Recife-PE, Brasil E-mail: manta.marilia@gmail.com

Aparecido Jonanthan Mandú de Araújo

Acadêmico de Farmácia pela Universidade Federal de Pernambuco-UFPE Instituição: Universidade Federal de Pernambuco
Endereço: Av. Prof. Moraes Rego, 1235- Cidade Universitária, Recife-PE, Brasil E-mail: Jonathan.mandu@outlook.com

Bárbara de Azevedo Ramos

Doutora em Ciências Biológicas pela Universidade Federal de Pernambuco-UFPE Instituição: Universidade Federal de Pernambuco
Endereço: Av. Prof. Moraes Rego, 1235- Cidade Universitária, Recife-PE, Brasil E-mail: barbara.azevedo@ufpe.br

Túlio Diego da Silva

Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste (CETENE) Instituição: Universidade Federal de Pernambuco
Endereço: Av. Prof. Moraes Rego, 1235- Cidade Universitária, Recife-PE, Brasil E-mail: tulio.silva@cetene.gov.br

Maria Tereza dos Santos Correia

Professora associada ao Departamento de Bioquímica da Universidade Federal de Pernambuco-UFPE
Instituição: Universidade Federal de Pernambuco
Endereço: Av. Prof. Moraes Rego, 1235- Cidade Universitária, Recife-PE, Brasil E-mail: mtscorreia@gmail.com

RESUMO: A resistência bacteriana aos antimicrobianos utilizados na clínica vêm crescendo de forma significativa nos últimos anos. Há diversos mecanismos que

a bactéria pode desenvolver para se tornar resistente. Um deles é a formação do biofilme, uma comunidade complexa de microrganismos envolvidos por uma matriz polissacarídica, que acaba funcionando como uma barreira protetora para as bactérias. Com essa estrutura, as infecções bacterianas se tornam mais virulentas e difíceis de tratar, trazendo risco pra saúde humana. Como os antimicrobianos utilizados na clínica já não são mais tão eficazes contra a grande maioria das espécies, se torna de fundamental importância a busca por compostos alternativos que tenham a capacidade de agir contra bactérias e até mesmo contra biofilmes. Dentre essas substâncias, há os compostos fenólicos, que compõe um grupo de compostos caracterizados por ter um anel aromático ligado a um ou mais grupo hidroxila. Estão presentes em grande quantidade em plantas, frutas, legumes e vegetais, e possuem diversas propriedades importantes como antioxidante, anti- inflamatória e antimicrobiano. Sendo assim, este trabalho busca agrupar informações sobre a ação dos diferentes compostos fenólicos contra bactérias e, principalmente, contra biofilmes bacterianos.

PALAVRAS-CHAVE: Compostos fenólicos. Biofilme. Resistência microbiana.

ABSTRACT: Bacterial resistance to antimicrobials used in the clinic has been growing significantly in recent years. There are several mechanisms that bacteria can develop to become resistant. One of them is the formation of biofilm, a complex community of microorganisms surrounded by a polysaccharide matrix, which ends up functioning as a protective barrier to bacteria. With this structure, bacterial infections become more virulent and difficult to treat, bringing risk to human health. As the antimicrobials used in the clinic are no longer as effective against the vast majority of species, it becomes of fundamental importance to search for alternative compounds that have the ability to act against bacteria and even against biofilms. Among these substances, there are phenolic compounds, which make up a group of compounds characterized by having an aromatic ring attached to one or more hydroxyl group. They are present in large quantities in plants, fruits, vegetables and vegetables, and have several important properties such as antioxidant, anti-inflammatory and antimicrobial. Thus, this work seeks to group information on the action of different phenolic compounds against bacteria and, mainly, against bacterial biofilms.

KEYWORDS: Phenolic compounds. Biofilm. Microbial resistance.

1. INTRODUÇÃO

No século XX houve a conhecida “Era de Ouro dos Antibióticos”, iniciada em 1941 com a descoberta de penicilina, seguida até os anos 1990. Houve produção de diversos medicamentos de classes distintas, como β -lactâmicos, tetraciclina, cloranfenicol, aminoglicosídeos, macrolídeos, glicopeptídeos e quinolonas. Eles eram produzidos principalmente a partir de microrganismos como *Streptomyces*, *Penicilliums*, *Actinomycetes* e *Bacilli* ou de forma sintética e semissintética. Nesta época, quase todas as infecções bacterianas eram tratáveis pelas drogas existentes, sem presença de resistência em larga escala (SILVA *et al.*, 2016; BBOSA *et al.*, 2014; HUTCHINGS; TRUMAN; WILKINSON, 2019).

Porém, desde o fim dessa era, não há descoberta significativa de novos medicamentos e, somado ao uso indiscriminado dos antibióticos e à aquisição de resistência pelas bactérias, a maioria dos fármacos existentes e utilizados hoje em dia já não são mais eficazes contra muitas espécies bacterianas. Dessa forma, iniciou-se uma busca por compostos originários de plantas que, além de serem abundantes na natureza, produzem metabólitos secundários com diversas propriedades, inclusive com ações contra microrganismos (SILVA *et al.*, 2016; BBOSA *et al.*, 2014; HUTCHINGS; TRUMAN; WILKINSON, 2019).

O metabolismo das plantas pode ser classificado como primário e secundário. O primário se refere ao metabolismo básico, comum praticamente a todas as espécies, e que é indispensável para a sua sobrevivência. Já o metabolismo secundário não está envolvido com processos básicos, como obtenção de nutrientes ou geração de energia, e os metabólitos secundários produzidos não existem igualmente entre as espécies e até mesmo entre os tecidos da planta. Devido às suas variadas propriedades biológicas, as substâncias secundárias já são amplamente utilizadas como princípio ativo de diversos produtos, inclusive de alguns cosméticos e fármacos. Os principais grupos de compostos secundários naturais são os compostos fenólicos, terpenos e substâncias nitrogenadas. Dentre eles, os compostos fenólicos são os mais pesquisados e que mais possuem atividade contra microrganismos (DE REZENDE *et al.*, 2016).

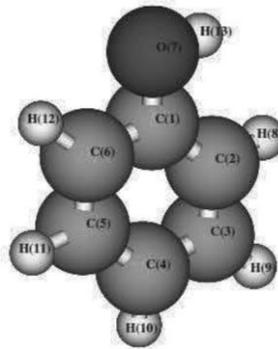
2. COMPOSTOS FENÓLICOS

Compostos fenólicos é um termo utilizado para nomear o grupo formado por uma grande quantidade de compostos químicos, caracterizados por ter ao menos

um anel aromático (nesse caso, o benzeno) ligado a um ou mais grupo hidroxila. A sua hidroxila é responsável por sua acidez, enquanto o anel benzeno caracteriza sua basicidade.

É um dos grupos químicos mais comumente encontrado em plantas, frutas, vegetais e legumes, e são responsáveis por dar o sabor e a coloração de frutas e vegetais. Nas plantas, são produzidos como metabólitos secundários pela via do ácido chiquímico e do acetato malonato, agindo na defesa contra radiação ultravioleta e agressões de patógenos (NGUYEN; KRYACHKO; VANQUICKENBORNE, 2003; CARTEA *et al.*, 2011; FARAH E DONANGELO, 2006).

Figura 1. Fórmula química básica do fenol. Os diversos tipos de fenóis são formados a partir dele.



Fonte: NGUYEN; KRYACHKO; VANQUICKENBORNE, 2003.

Além de ser encontrado em plantas e ter diversas funções nesses organismos, os fenóis também têm importância para nós. Possuem alguns efeitos fisiológicos como: antialérgico, anti-inflamatório, antimicrobiano, antitrombótico, antioxidante, cardioprotetor e vasodilatador e, por isso, têm recebido cada vez mais atenção da indústria farmacêutica e alimentícia. No nosso plasma, por exemplo, há a presença do -tocoferol, um fenol constituinte da vitamina E que age como importante antioxidante. Alguns desses compostos têm possível ação também como protetor contra doenças degenerativas crônicas, como catarata, degeneração macular, doenças neurodegenerativas e diabetes mellitus (FARAH E DONANGELO, 2006; NGUYEN; KRYACHKO; VANQUICKENBORNE, 2003; DE REZENDE *et al.*, 2016).

O grupo contém diversos compostos químicos distintos (cerca de oito mil) que variam desde compostos simples, com baixo peso molecular e com apenas

um anel aromático para os mais complexos, formando os polifenóis. Os compostos desse grupo podem ser classificados de diversas formas. Segundo a classificação de Harborne e Simmonds (1964), eles são classificados em grupos distintos de acordo com o número de carbono em sua molécula. Os fenóis encontrados em plantas são classificados principalmente de acordo com o número e arranjo dos átomos de carbono como flavonóides ou não-flavonóides, e em subclasses de acordo com substituições em sua estrutura básica, associação com carboidratos e formação de polímeros (CARTEA *et al.*, 2011; FARAH E DONANGELO, 2006).

Flavonóides são compostos polifenólicos com quinze moléculas de carbono e dois anéis aromáticos ligados por pontes de carbono. Correspondem à maior quantidade de compostos fenólicos. Estão presentes principalmente em folhas e frutas, e possuem ação na proteção contra raios UV, pigmentação, fixação do nitrogênio e proteção contra pragas. No nosso corpo, os flavonóides possuem ação antioxidante, anti-inflamatória, anti- mutagênica e anti-carcinogênica (CARTEA *et al.*, 2011; PANCHE; DIWAN; CHANDRA, 2016).

Em 1865, Joseph Lister utilizou pela primeira vez fenol durante uma cirurgia, para desinfetar instrumentos e roupas cirúrgicas e observou que, com o uso desse composto, os pacientes tinham menos infecção e corriam menos risco de vida. A partir disso, fenol passou a ser bastante utilizado como um antisséptico. Hoje se sabe que essa classe de compostos em grande quantidade possui efeito tóxico para o organismo. Mas, na época, seu efeito benéfico como antisséptico levou vantagem em cima disso (NGUYEN; KRYACHKO; VANQUICKENBORNE, 2003).

Tabela 1. Principais classes de compostos fenólicos presentes em plantas.

Classes e sub-classes	Exemplos de compostos
Não flavonoides	
Ácidos fenólicos	
Ácidos benzoicos	Ácido gálico, ácido protocatecuído, ácido p-hidroxibenzoico
Ácido hidroxicinâmico	Ácido cumárico, ácido cafeico, ácido ferrúlico, ácido sináptico
Taninos hidrolisáveis	Pentagalolil glicose
Estilbenos	Resveratrol
Ligninas	Secoisolariciresinol, matairesinol, lariciresinol, pinoresinol
Flavonoides	
Flavonois	Rutina, quercetina

Flavonas	Apigenina, Luteolina
Flavanonas	Naringerina, hesperetina
Flavanois	Catequinas, galocatequinas
Antocianidinas	Pelargonidina, cianidina, malvadina
Taninos condensados ou proantocianidinas	Procianidina trimérico, prodelfinidinas
Isoflavonas	Daidzeína, genistina, gliciteína

Fonte: Adaptado de Farah e Donangelo, 2006.

Diversos compostos naturais já se mostraram eficazes contra bactérias, agindo contra a comunicação bacteriana, contra a motilidade, inibindo toxinas, impedindo a produção enzimática, alterando seu metabolismo ou agindo sobre a formação do biofilme bacteriano. Essas ações acabam levando à morte das bactérias ou podem atrapalhar seu metabolismo, fazendo com que não consigam se multiplicar (KUMAR *et al.*, 2007; SATISH; RAGHAVENDRA; RAVEESHA, 2008).

Quanto aos compostos fenólicos, especificamente, estudos mostram que eles são bastante eficazes contra mecanismos bacterianos de um modo geral. Cumarinas, flavonóides, ácidos fenólicos e taninos conseguem agir impedindo ou alterando a comunicação por Quorum sensing de algumas espécies Gram-positivas e Gram-negativas, como *Serratia marcescens*, *Pseudomonas*, *Staphylococcus aureus* e *Chromobacterium violaceum*. Ligninas, quinonas, fenilpropanóides, cumarina e flavanóides têm ação contra a motilidade bacteriana, que é muito importante para bactéria, e pode ser considerada como um fator de virulência da mesma, visto que permite que ela colete nutrientes do ambiente e colonize novos lugares (SILVA *et al.*, 2016).

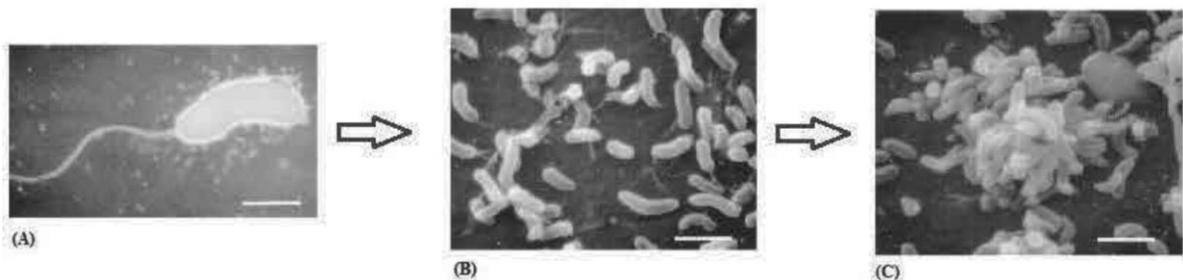
Como mostrou Cartea *et al.*, (2011), no estudo de Ayaz *et al.*, (2008), frações fenólicas ricas em quercitina e derivados de kaempferol se mostraram eficazes contra o crescimento de Gram-positivas e Gram-negativas, como *S. aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Bacillus subtilis* e *Moraxella catarrhalis*. Além disso, estudos mostram que compostos fenólicos já se mostraram eficazes na inibição do crescimento, de toxinas, enzimas e da formação de biofilme de diversas espécies bacterianas (CUEVA *et al.*, 2010; BOUND *et al.*, 2015).

3. COMPOSTOS FENÓLICOS CONTRA BIOFILMES BACTERIANOS

Bactérias podem viver em forma de vida livre (planctônica) ou podem se aderir a um substrato formando biofilmes, onde estão na forma de vida sésil. Biofilme é uma comunidade estruturada de bactérias envoltas por uma matriz polissacarídica e que estão aderidas a uma superfície. Ele está presente na maioria das infecções bacterianas, sendo formado em diversas condições e ambientes. Seu mecanismo de formação é bastante complexo onde, no fim, tem uma estrutura resistente e bem arquitetada, com a formação de um ambiente favorável para o organismo em seu interior. Devido à sua matriz polissacarídica e por características de sua estrutura, o biofilme funciona como um mecanismo de resistência e de virulência bacteriana. Dessa forma, infecções bacterianas onde haja a formação de biofilme normalmente são mais agressivas e duradouras (COSTERTON *et al.*, 1999; MAH, 2012; TRENTIN, 2013).

Essa forma de vida sésil vem trazendo cada vez mais desafios para o tratamento de infecções bacterianas, pois infecções relacionadas ao biofilme estão mais associadas a um aumento de mortalidade e morbidade. Tendo o conhecimento da crescente resistência bacteriana, com os antibióticos existentes já não sendo mais eficazes contra grande parte das espécies, ampliou-se a busca por compostos que agissem contra essa forma de vida, impedindo a formação de biofilmes ou com a capacidade de destruí-lo. Dentre esses compostos, estão os compostos fenólicos (SILVA *et al.*, 2016; SATPATHY *et al.*, 2016).

Figura 2. Microscopia da formação do biofilme. (A) célula bacteriana planctônica, visualizada por meio de Microscopia Eletrônica de Transmissão. (B) células bacterianas aderidas na superfície e (C) células formando microcolônias de biofilme, ambas visualizadas por meio de Microscopia Eletrônica de Varredura.



Fonte: adaptado de Watnick e Kolter (2000).

Diversos compostos fenólicos vêm se mostrando eficientes na supressão da formação do biofilme bacteriano de diversas espécies. *S. aureus* é uma Gram-positiva com uma grande patogenicidade, onde suas infecções estão muitas vezes relacionadas com a formação de biofilme, principalmente em dispositivos médicos

como válvulas coronarianas, cateteres e próteses. Diversos compostos fenólicos já se mostraram eficazes contra o biofilme desta espécie, como flavonóides, xanthohumol, ácido gálico, proantocianidinas, ácido elágico, ácido tânico, ácido ginkgólico e ácido rosmarínico (TRENTIN *et al.*, 2015; SLOBODNÍKOVÁ *et al.*, 2016; LIU *et al.*, 2017).

Pseudomonas aeruginosa é um patógeno oportunista Gram-negativo, comumente associado a infecções do trato urinário e do sistema respiratório, e possui a capacidade de formar biofilme nos mais variados ambientes. A formação de biofilme por esse microrganismo está bastante associada a infecções pulmonares e a fibrose cística crônica. Estudos mostram que compostos fenólicos se mostraram eficazes contra o seu biofilme, como a cumarina, catequina, flavanóides, quercitina, ácido gálico, ácido ferrúlico e ácido tânico (BANIN; VASIL; GREENBERG, 2005; BORGES; SAAVEDRA; SIMÕES, 2012; SIDDIQUI *et al.*, 2015; PEJIN *et al.*, 2015; ONSARE E ARORA, 2015; URQUHART *et al.*, 2018).

Klebsiella pneumonia é um patógeno comumente associado a infecções hospitalares. Esta bactéria também é forte formadora de biofilme, principalmente em cateteres urinários e outros dispositivos médicos, sendo de grande preocupação para a área médica. Estudos mostram que extratos de diversas plantas ricas em flavonóides, ácido gálico, ácido ferrúlico, ácido cafeico, ácido elágico, catequina e quercitina se mostraram eficazes contra biofilmes de *K. pneumonia* (IBRAHIM, 2017; ROY *et al.*, 2018; THININA *et al.*, 2020).

Enterococcus spp. são Gram-positivos habitantes natural da cavidade oral, gastrointestinal e do trato genital feminino. Mesmo presentes no organismo, as espécies desse gênero conseguem causar infecções no trato urinário, no sangue e até no sistema nervoso. As duas principais espécies desse gênero, *E. faecalis* e *E. faecium* são importantes patógenos formadores de biofilme. Diversos taninos, quercitina, proantocianidina, catequina e flavonóide se mostraram eficazes contra a formação de biofilme de *Enterococcus* (MOHAMED E HUANG, 2007; SILVA *et al.*, 2016; HAKIKI *et al.*, 2017; MEMARIANI *et al.*, 2019).

Outro microrganismo bastante presente em infecções e com alta capacidade de formação de biofilme é *Escherichia coli*. Naturalmente, *E. coli* coloniza o trato gastrointestinal humano, mas pode vir a causar graves infecções associadas à biofilme. Quercitina, catequina, ácido clorogênico, ácido cafeico, ácido elágico, ácido gálico, ácido ferrúlico, cumarina e ácido tânico reduziu biofilme de *E. coli*

significativamente (BELOIN *et al.*, 2008; BORGES; SAAVEDRA; SIMÕES, 2012; CEYLAN E ALIC, 2015; SILVA *et al.*, 2016; SLOBODNÍKOVÁ *et al.*, 2016).

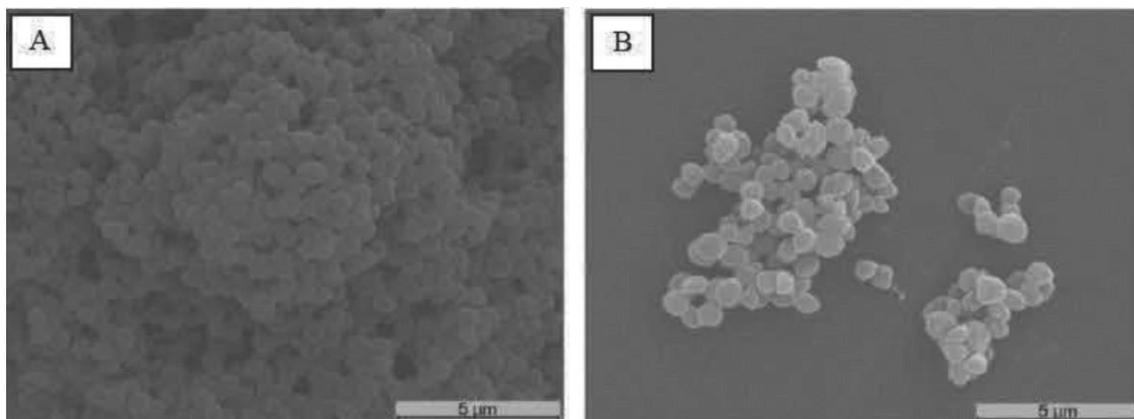
Streptococcus mutans é um patógeno Gram-positivo, principalmente associado a formação de biofilme em dentes de animais e humanos, formando placas e cáries. Proantocianidinas, xantonas, ácido tânico, ligninas, ácido gálico, quinonas, ácido salicílico, ácido gálico, metilgalato, quercitina, quercitrina, chalcona e fenóis simples foram alguns dos compostos fenólicos que tiveram alguma ação contra o biofilme de *S. mutans* (KOO *et al.*, 2003; SILVA *et al.*, 2016; SLOBODNÍKOVÁ *et al.*, 2016).

Os compostos fenólicos podem agir contra biofilme por diversos mecanismos. O primeiro estágio para a formação do biofilme é a adesão da bactéria ao substrato. Para isso acontecer, a bactéria, até então no estado planctônico, deve se mover em direção à superfície, seja por meio do fluxo no meio ou pela presença de pilis e flagelos. O ácido ferrúlico e o ácido gálico agem reduzindo a formação do biofilme e a motilidade de espécies Gram-positivas e Gram-negativas. Dessa forma, a menor motilidade dos microrganismos pode estar relacionada a uma menor adesão bacteriana e, conseqüentemente, menor formação dessa estrutura (BORGES *et al.*, 2012).

Algumas bactérias, principalmente as Gram-negativas, utilizam como molécula sinalizadora no *Quorum sensing* a N-acil homo-serina lactona (AHL). Essa molécula tem a função de controlar a expressão de genes responsáveis pela densidade e maturação do biofilme. Alguns polifenóis podem agir penetrando no biofilme e inibindo a sinalização da AHL. Como consequência, há uma perda na densidade bacteriana dentro do biofilme e conseqüentemente a destruição da estrutura (PLYUTA *et al.*, 2013; ROY *et al.*, 2018).

Taninos podem agir quebrando peptideoglicanos que está presente na parede bacteriana. Essa quebra leva a uma alteração na composição de proteínas e ácido teóicos da parede, reduzindo a capacidade de formação do biofilme. A clivagem dos peptideoglicanos também pode fazer com que haja liberação de moléculas sinalizadoras, modulando a expressão de genes associados à produção da estrutura. Podem agir também se ligando aos peptideoglicanos e causando danos na parede celular, impedindo a adesão bacteriana e levando a alterações na biomassa e viabilidade do biofilme (HUBER *et al.*, 2003; LUÍS *et al.*, 2013; ROY *et al.*, 2018).

Figura 3. Imagens de biofilmes formados por Microscopia Eletrônica de Varredura. (A) biofilme formado de *S. aureus*. (B) biofilme de *S. aureus* formado na presença de ácido clorogênico.



Fonte: Adaptado de Luís *et al.*, (2013).

Mas a eficácia dos compostos fenólicos contra o biofilme pode depender de alguns fatores, como pH, concentração ou características da espécie bacteriana em questão. O estudo de Silva *et al.* (2016) busca avaliar o efeito de alguns ácidos fenólicos (ácido clorogênico, ferrúlico, gálico, cafeico, cumárico, siríngico e sinápico) contra o biofilme de diversas espécies. Os autores observaram, nesse estudo, que a ação dos ácidos contra o biofilme das espécies tinha direta relação com o pH. Uma variação no pH leva as moléculas ácidas a diferentes níveis de protonação e, conseqüentemente, a diferentes interações físico-químicas com os microrganismos. Por isso, a ação dos compostos fenólicos ácidos contra o biofilme pode variar.

Plyuta *et al.*, (2013) mostraram em seu estudo que o efeito de alguns compostos fenólicos contra o biofilme de *P. aeruginosa* era dependente da concentração utilizada. Nas concentrações dos compostos onde o crescimento bacteriano não era alterado, a formação do biofilme era estimulada. Em concentrações mais altas, onde o crescimento bacteriano era reduzido, o biofilme era inibido. Os autores observaram que concentrações sub-inibitórias de alguns fenóis agiam aumentando a expressão de AHL, aumentando a densidade bacteriana e, por isso, a formação do biofilme era aumentada.

4. CONCLUSÃO

Tendo o conhecimento das características e perigo da formação do biofilme pelas bactérias, o estudo dessa forma de vida e compostos capazes de

eliminá-lo são de grande importância atualmente. Com as informações coletadas, é possível observar que diversos compostos fenólicos possuem ação tanto antimicrobiana como ação contra o biofilme das principais espécies formadoras. Contudo, essa ação deve levar em consideração algumas variáveis, como o pH do meio, concentrações sub-inibitórias e características particulares de cada bactéria. Dessa forma, podem funcionar como alternativa para eliminação dessa forma de vida, facilitando o acesso e ação dos antimicrobianos nas infecções.

REFERÊNCIAS

- AYAZ, F. A. et al. Phenolic acid contents of kale (*Brassica oleraceae* L. var. *acephala* DC.) extracts and their antioxidant and antibacterial activities. **Food Chemistry**, v. 107, n. 1, p. 19-25, 2008.
- BANIN, E., VASIL M. L., GREENBERG, E. P. Iron and *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 102, n. 31, p. 11076- 11081, 2005.
- BBOSA, G. S. et al. Antibiotics/antibacterial drug use, their marketing and promotion during the post-antibiotic golden age and their role in emergence of bacterial resistance. **Health**, v. 2014, 2014.
- BELOIN, Christophe; ROUX, Agnès; GHIGO, J.-M. *Escherichia coli* biofilms. In: **Bacterial biofilms**. Springer, Berlin, Heidelberg, 2008. p. 249-289.
- BORGES, A., SAAVEDRA, M. J., SIMÕES, M. The activity of ferulic and gallic acids in biofilm prevention and control of pathogenic bacteria. **Biofouling**, v. 28, n. 7, p. 755- 767, 2012.
- BOUND, D. J., MURTHY, P. S., SRINIVAS, P. Synthesis and antibacterial properties of 2,3- dideoxyglucosides of terpene alcohols and phenols. **Food chemistry**, v. 185, p. 192-199, 2005.
- CARTEA, María Elena et al. Phenolic compounds in Brassica vegetables. **Molecules**, v. 16, n. 1, p. 251-280, 2011.
- CEYLAN, O., ALIC, H. Antibiofilm, antioxidant, antimutagenic activities and phenolic compounds of *Allium orientale* BOISS. **Brazilian archives of biology and technology**, v. 58(6), p. 935-943, 2015.
- COSTERTON, J.W., STEWART, P.S., GREENBERG, E.P. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. **Microbes, Immunity and Disease**, v. 284, p. 1318-1322, 1999.
- CUEVA, C. et al. Antimicrobial activity of phenolic acids against commensal, probiotic and pathogenic bacteria. **Research in microbiology**, v. 161, n. 5, p. 372-382, 2010.
- DE REZENDE, F. M. et al. Vias de síntese de metabólitos secundários em plantas. **Laboratório de Ensino de Botânica**, p. 93, 2016.

FARAH, A.; DONANGELO, C. M. Phenolic compounds in coffee. **Braz. J. Plant Physiol.**, v. 18(1), p. 23-26, 2006.

HAKIKI, D. *et al.* Effectiveness of flavonoid from mangosteen pericarp (*Garcinia mangostana* L.) as *Enterococcus faecalis* antibiofilm. **Conservative Dentistry Journal**, v. 7, n. 1, p. 18- 22, 2017.

HARBORNE, J. B.; SIMMONDS, N. W. Biochemistry of phenolic compounds, London: Acad. Press, London, p. 101, 1964.

HUBER, B. *et al.* Influence of polyphenols on bacterial biofilm formation and quorum-sensing. **Zeitschrift für Naturforschung C**, v. 58, n. 11-12, p. 879-884, 2003.
HUTCHINGS, M. I., TRUMAN, A. W., WILKINSON, B. Antibiotics: past, present and future. **Current opinion in Microbiology**, v. 51, p. 72-80, 2019.

IBRAHIM, I. A. J. Study the Effect of some Medical Plants in Biofilm Formation and Antibiotic Sensitivity for Klebsiella Pneumoniae. **Iraqi Journal of Science**, v. 58, n. 2C, p. 971-983, 2017.

KOO, H. *et al.* Inhibition of *Streptococcus mutans* biofilm accumulation and polysaccharide production by apigenin and tt-farnesol. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 52, n. 5, p. 782-789, 2003.

KUMAR, G. S. *et al.* Antimicrobial effects of Indian medicinal plants against acne-inducing bacteria. **Tropical journal of pharmaceutical research**, v. 6, n. 2, p. 717-723, 2007.

LIU, M. *et al.* The specific anti-biofilm effect of gallic acid on *Staphylococcus aureus* by regulating the expression of the *ica* operon. **Food Control**, v. 73, p. 613-618, 2017.

LUÍS, Â. *et al.* Atividades antiestafilocócicas e inibitórias do biofilme dos ácidos gálico, caféico e clorogênico. **Biofouling**, v. 30, n. 1, pág. 69-79, 2014.

MAH, T. Biofilm-specific antibiotic resistance. **Future microbiology**, v. 9, p. 1061-1072, 2012.

MEMARIANI, H.; MEMARIANI, M.; GHASEMIAN, A. An overview on anti-biofilm properties of quercetin against bacterial pathogens. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 35, n. 9, p. 143, 2019.

MOHAMED, J. A.; HUANG, D. B. Biofilm formation by enterococci. **Journal of medical microbiology**, v. 56, n. 12, p. 1581-1588, 2007.

NGUYEN, M. T.; KRYACHKO, E. S.; VANQUICKENBORNE, L. G. General and theoretical aspects of phenol. **The chemistry of phenols**, p. 1-198, 2003.

ONSARE, J. G.; ARORA, D. S. Antibiofilm potential of flavonoids extracted from *Moringa oleifera* seed coat against *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* and

Candida albicans. **Journal of applied microbiology**, v. 118, n. 2, p. 313-325, 2015.

PANCHE, A. N.; DIWAN, A. D.; CHANDRA, S. R. Flavonoids: an overview. **Journal of nutritional science**, v. 5, p. 1-15, 2016.

PEJIN, Boris *et al.* Quercetin potently reduces biofilm formation of the strain *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 in vitro. **Current Pharmaceutical Biotechnology**, v. 16, n. 8, p. 733-737, 2015.

ROY, R. *et al.* Strategies for combating bacterial biofilms: A focus on anti-biofilm agents and their mechanisms of action. **Virulence**, v. 9, n. 1, p. 522-554, 2018.

SATISH, S.; RAGHAVENDRA, M. P.; RAVEESHA, K. A. Evaluation of the antibacterial potential of some plants against human pathogenic bacteria. **Advances in biological research**, v. 2, n. 3-4, p. 44-48, 2008.

SATPATHY, S. *et al.* Review on bacterial biofilm: An universal cause of contamination. **Biocatalysis and agricultural biotechnology**, v. 7, p. 56-66, 2016.

SIDDIQUI, M. F. *et al.* The efficacy of tannic acid in controlling biofouling by *Pseudomonas aeruginosa* is dependent on nutrient conditions and bacterial density. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 104, p. 74-82, 2015.

SILVA, L. N. *et al.* Plant natural products targeting bacterial virulence factors. **Chemical reviews**, v. 116, n. 16, p. 9162-9236, 2016.

SILVA, S. *et al.* Anti-biofilm potential of phenolic acids: the influence of environmental pH and intrinsic physico-chemical properties. **Biofouling**, v. 32, n. 8, p. 853-860, 2016.

SLOBODNÍKOVÁ, L. *et al.* Antibiofilm activity of plant polyphenols. **Molecules**, v. 21, n. 12, p. 1717, 2016.

THININA, A. C. *et al.* Evaluation and quantification of the inhibition of biofilm and planktonic forms of *Klebsiella pneumoniae* by the polyphenolic extract of *Pulicaria crispata*. **Journal of Advanced Pharmaceutical Technology & Research**, v. 11, n. 3, p. 117, 2020.

TRENTIN, D.S., GIODANI, R.B., MACEDO, A.J. Biofilmes bacterianos patogênicos: aspectos gerais, importância clínica e estratégias de combate. **Revista Liberato**, v. 14, p. 113-238, 2013.

TRENTIN, D. S. *et al.* Natural green coating inhibits adhesion of clinically important bacteria. **Scientific reports**, v. 5, p. 8287, 2015.

URQUHART, C. *et al.* ATIVIDADE ANTIBIOFILME DA CUMARINA FRENTE À PSEUDOMONAS AERUGINOSA. **Anais do Salão Internacional de Ensino, Pesquisa e Extensão**, v. 10, n. 2, 2018.

WATNICK, P., KOLTER, R. Biofilm, city of microbes. **Journal of Bacteriology**, v. 182 (10), p. 2675-2679, 2000.

