

UNIVERSIDADE DO ALGARVE
Faculdade de Ciências e Tecnologia

**Impacto da utilização de ácido gálgico, ácido ferúlico e
eugenol em modo contínuo na suscetibilidade de *Pseudomonas
aeruginosa***

Andreia Patrícia Ângelo Nunes

**DISSERTAÇÃO PARA A OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE EM BIOLOGIA MOLECULAR
E MICROBIANA**

**Faro, Portugal
2016**

UNIVERSIDADE DO ALGARVE
Faculdade de Ciências e Tecnologia

**Impacto da utilização de ácido gálgico, ácido ferúlico e
eugenol em modo contínuo na suscetibilidade de *Pseudomonas
aeruginosa***

Andreia Patrícia Ângelo Nunes

Dissertação apresentada para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção
do grau de Mestre em Biologia Molecular e Microbiana

Dissertação orientada pela Professora Doutora Maria Leonor Faleiro e pela
Professora Doutora Maria Graça Miguel

Faro, Portugal

2016

Dissertação de candidatura ao grau de mestre em Biologia Molecular e Microbiana
Área de Microbiologia pela Universidade do Algarve

MSc Thesis in Molecular and Microbial Biology
Area of Microbiology by Universidade do Algarve

As opiniões expressas nesta publicação são da exclusiva responsabilidade do seu autor.
The opinions expressed in this dissertation are of the exclusive responsibility of the author.

(Andreia Patrícia Ângelo Nunes)

Declaração de autoria de trabalho

Declaro ser o autor deste trabalho, que é original e inédito. Autores e trabalhos consultados estão devidamente citados no texto e constam da listagem de referências incluída.

Andreia Nunes

©Copyright: Andreia Nunes

A Universidade do Algarve tem o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicitar este trabalho através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por outro qualquer meio conhecido ou que venha a ser inventado, de o divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objetivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

Andreia Nunes

Agradecimentos

À minha orientadora, a Professora Doutora Maria Leonor Faleiro, pela disponibilidade e paciência, pela orientação, partilha do saber e apoio prestado na realização deste trabalho.

À minha coorientadora, a Professora Doutora Maria da Graça Miguel, pela orientação e colaboração neste projeto onde sempre demonstrou a sua disponibilidade e interesse.

Aos meus pais por todos os sacrifícios, por acreditarem em mim e pelo investimento na minha formação. Sem eles nada disto seria possível e foram uma das minhas principais motivações para sempre seguir em frente.

À minha avó pelo amor incondicional e pela orientação nos momentos de desorientação.

Ao meu irmão por me aturar e me ouvir e pela sua capacidade em relativizar todas as situações.

À minha tia Susana por todo o incentivo e por sempre me compreender.

Aos meus colegas de laboratório Pei, Soraia e Nivia pela amizade, carinho e motivação e pela companhia nas horas de trabalho ao longo desta jornada.

Ao Zé pela amizade e colaboração neste projeto. Sempre deste tudo sem pedir nada em troca. É bom saber que ainda existem pessoas com bom coração.

À Liseta pelos bons momentos partilhados, pelo incentivo e força. Recebeste-me de braços abertos e foste muito mais do que uma colega de laboratório. Foste como uma segunda mãe.

À Catarina e ao André, os meus dois companheiros inseparáveis nesta jornada, à Adriana, Lynn e Dorothy que sempre me fizeram ver o copo meio cheio. Obrigado pelas cafezadas e pela amizade.

A todos os meus amigos que de uma forma ou de outra me ajudaram e me apoiaram ao longo deste trabalho, estimulando-me intelectual e emocionalmente.

Resumo

A bactéria *Pseudomonas aeruginosa* é responsável por infecções associadas à cateterização de doentes hospitalizados tendo também uma elevada incidência em infecções em queimados. Devido à sua grande capacidade de aquisição de resistência aos antibióticos utilizados no seu tratamento esta tem sido alvo de preocupação por parte da comunidade médica e investigadores. Por este motivo existe uma necessidade de procura de novos compostos com atividade antibacteriana que possam substituir os antibióticos atualmente em uso ou atuar em sinergia com os mesmos. A tendência tem sido procurar/extrair compostos presentes na natureza e utilizá-los no tratamento de infecções bacterianas.

O medronheiro (*Arbutus unedo* L.) é um arbusto com distribuição mediterrânica cujo fruto (medronho) tem sido essencialmente usado na produção de bebidas destiladas (aguardente de medronho). Também as suas folhas têm sido usadas, desde tempos antigos, na medicina tradicional e existem estudos que lhe conferem propriedades biológicas. Contudo são limitados os estudos que se debruçaram sobre a bioatividade do medronho.

O principal objetivo deste trabalho consistiu em verificar a eficácia de dois componentes do extrato do medronho, o ácido gálgico e o ácido ferúlico, e de um componente maioritário naturalmente presente no óleo essencial do cravo-da-índia (*Syzygium aromaticum* (L.) Merrill & Perry), o eugenol, contra três estirpes de *P. aeruginosa*. Além disso pretendeu-se estudar a aquisição de respostas de tolerância desta bactéria a esses compostos. Os resultados obtidos demonstraram, para os três componentes, um efeito inibitório sobre as estirpes bacterianas estudadas. Verificado o seu efeito sobre o crescimento bacteriano, submeteu-se a bactéria à exposição contínua e sequencial a concentrações sub-letais dos componentes em estudo e avaliou-se o efeito desta adaptação sobre o perfil de suscetibilidade aos antibióticos e aos próprios componentes observando-se que a exposição repetida da bactéria aos componentes não conduziu a nenhum decréscimo na suscetibilidade aos mesmos, o que apoia a hipótese da não aquisição de resistência a componentes naturais. Contudo verificou-se a aquisição de resistência à ciprofloxacina e à eritromicina, após adaptação ao eugenol e ao ácido ferúlico, respetivamente. Avaliou-se também o efeito da adaptação ao eugenol sobre o sistema de perceção de quórum, tendo-se observado que a adaptação ao eugenol inibiu a síntese de homoserina em *P. aeruginosa*. Por último, estudou-se o efeito da adaptação ao eugenol (1313,6 µg/ml) no potencial de virulência no modelo *Galleria mellonella*, tendo-

se observado que a adaptação ao eugenol não conduziu a alterações na mortalidade das larvas.

Com este trabalho conclui-se que o ácido ferúlico e o eugenol são agentes antibacterianos eficazes contra *P. aeruginosa* e que a exposição contínua aos mesmos não induz resistência nem aos próprios componentes nem aos outros agentes antimicrobianos testados.

Palavras-chave: *Pseudomonas aeruginosa*, ácido gálgico, ácido ferúlico, eugenol, adaptação, percepção de quórum, virulência, *Galleria mellonella*.

Abstract

The *Pseudomonas aeruginosa* bacterium is responsible for infections associated with catheterization of hospitalized patients and also has a high incidence in infections in burn injuries. Due to its high capability of acquiring resistance to the antibiotics used in its treatment, this has been a big concern for the medical and investigation community. For this reason, there is a need for searching new compounds with antibacterial activity that may replace the antibiotics currently in use or act in synergy with them. The tendency has been to search/extract compounds from the environment and use them in the treatment of bacterial infections.

The strawberry tree (*Arbutus unedo* L.) is an evergreen shrub native from the Mediterranean region whose fruit has been essentially used in the production of alcoholic beverages. Its leaves have also been used since old times in the traditional medicine and there are studies that grant them biological properties. However, the fruit itself has never been studied.

The main purpose of this research was to verify the efficacy of two major components from the fruits' extract, the gallic and ferulic acids, and another major component naturally present in the essential clove (*Syzygium aromaticum* (L.) Merrill & Perry) oil, the eugenol, against three strains of *P. aeruginosa*. Besides that we aimed to evaluate the acquisition of tolerance to these compounds. The results showed an inhibitory effect of the three components against the three strains. After verifying its effect on bacterial growth, we submitted the bacteria to a continuous and sequential exposure to sub lethal concentrations of the components in study and we evaluated the effect of this adaptation on the susceptibility profile to the antibiotics and to the components themselves. It was observed that the continuous exposure of the bacteria to the components did not lead to any decrease in its susceptibility, which supports the hypothesis that they do not acquire resistance to natural components. In spite of that, it was verified the acquisition of resistance to ciprofloxacin and erythromycin, after adapting to eugenol and ferulic acid, respectively. It was also evaluated the effect of the adaptation to eugenol in the quorum sensing system, revealing that the homoserine synthesis in *P. aeruginosa* was inhibited. No effect of adaptation to eugenol on the virulence potential using the *Galleria mellonella* was observed.

With this research we could conclude that the ferulic acid and eugenol are effective antibacterial agents against *P. aeruginosa* and the continuous exposure to them does not induce resistance to the components themselves neither to the majority of the antimicrobial agents tested.

Keywords: *Pseudomonas aeruginosa*, gallic acid, ferulic acid, eugenol, adaptation, quorum sensing, virulence, *Galleria mellonella*.

Índice

1. Introdução.....	1
1.1. Caracterização de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	2
1.2. Doenças associadas à bactéria <i>P. aeruginosa</i>	2
1.3. A formação de biofilme por <i>P. aeruginosa</i>	4
1.4. O desenvolvimento de resistências aos antibióticos por <i>P. aeruginosa</i>	5
1.5. O sistema de percepção de quórum de <i>P. aeruginosa</i>	8
1.6. Os fatores de virulência de <i>P. aeruginosa</i>	11
1.7. Modelos animais da infecção por <i>P. aeruginosa</i>	11
1.8. Utilização de compostos naturais no combate a resistências aos antibióticos	
13	
1.8.1. Compostos bioativos de <i>Arbutus unedo</i>	14
1.8.1.1. Propriedades antibacterianas do ácido gálgico	15
1.8.1.2. Propriedades antibacterianas do ácido ferúlico	16
1.8.2. Propriedades antibacterianas do Eugenol	17
1.9. Objetivos	18
2. Material e Métodos.....	19
2.1. Equipamentos	19
2.2. Meios de cultura.....	19
2.3. Material Biológico.....	20
2.3.1. Componentes do extrato de <i>A. unedo</i> e de óleo essencial de cravinho... 20	
2.3.2. Bactérias.....	20
2.4. Determinação dos valores de Concentração Mínima Inibitória e	
Concentração Mínima Bactericida.....	21
2.5. Avaliação do efeito da utilização dos compostos em modo contínuo, na	
suscetibilidade de <i>P. aeruginosa</i> aos antibióticos	23
2.6. Determinação dos perfis de suscetibilidade aos antibióticos.....	24

2.7.	Avaliação do efeito da utilização do eugenol no sistema de percepção de quórum de <i>Chromobacterium violaceum</i>	25
2.8.	Avaliação do potencial de virulência de <i>P. aeruginosa</i> após exposição em contínuo ao eugenol utilizando o modelo <i>Galleria mellonella</i>	28
3.	Resultados e Discussão.....	30
3.1.	Suscetibilidade de <i>P. aeruginosa</i> ao ácido ferúlico, ácido gálico e ao eugenol	30
3.2.	Suscetibilidade ao eugenol.....	35
3.3.	Avaliação da resposta de adaptação ao ácido ferúlico e ao eugenol.....	37
3.4.	Determinação dos perfis de suscetibilidade aos antibióticos após a adaptação ao ácido ferúlico e ao eugenol	40
3.4.1.	Determinação do perfil de suscetibilidade aos antibióticos após adaptação ao ácido ferúlico	40
3.4.2.	Determinação do perfil de suscetibilidade aos antibióticos após adaptação ao eugenol	42
3.5.	Avaliação do impacto da adaptação ao eugenol no sistema de percepção de quórum.....	47
3.5.1.	Determinação da atividade antibacteriana do eugenol sobre <i>Chromobacterium violaceum</i> CV026.....	47
3.5.2.	Avaliação da degradação de C ₆ -HSL pelo eugenol.....	48
3.5.3.	Avaliação do efeito do eugenol na síntese de AHL por <i>P. aeruginosa</i>	49
3.6.	Avaliação do impacto da adaptação ao eugenol na virulência de <i>P. aeruginosa</i> recorrendo ao modelo <i>Galleria mellonella</i>	50
4.	Conclusões	53
5.	Referências Bibliográficas	56

Índice de Figuras

Figura 1.3.1- Representação esquemática de um biofilme de <i>P. aeruginosa</i> com exemplos de mecanismos de resistência adaptativa adquiridos durante o crescimento. Adaptado de de la Fuente-Núñez et al. 2013.	5
Figura 1.5.1 – Representação esquemática do sistema de PQ LuxI/LuxR comum à maioria das bactérias Gram negativas. Adaptado de Bassler (1999).	9
Figura 1.5.2 – Representação esquemática dos sistemas de PQ Las e Rhl em <i>P. aeruginosa</i> . Adaptado de O’Loughlin et al. (2013).	10
Figura 1.8.1.1.1 – Estrutura química do ácido gálico.	16
Figura 1.8.1.2.1– Estrutura química do ácido ferúlico	17
Figura 1.8.2.1 – Estrutura química do eugenol.	18
Figura 3.1.1- Crescimento de <i>P. aeruginosa</i> DSM 939 na ausência (controle) e na presença de diferentes concentrações ($\mu\text{g/mL}$) de ácido gálico e do antibiótico cloranfenicol (CLO) (30 $\mu\text{g/mL}$)	30
Figura 3.1.2 - Crescimento de <i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853 na ausência (controle) e na presença de diferentes concentrações ($\mu\text{g/mL}$) de ácido gálico, do antibiótico cloranfenicol (CLO) (30 $\mu\text{g/mL}$)	31
Figura 3.1.3 - Crescimento de <i>P. aeruginosa</i> UAlg 114 na ausência (controle) e na presença de diferentes concentrações ($\mu\text{g/mL}$) de ácido gálico, do antibiótico cloranfenicol (CLO) (30 $\mu\text{g/mL}$)	31
Figura 3.1.4- Crescimento de <i>P. aeruginosa</i> DSM 939 na ausência (controle) e na presença de diferentes concentrações ($\mu\text{g/mL}$) de ácido ferúlico, do antibiótico cloranfenicol (CLO) (30 $\mu\text{g/mL}$)	33

Figura 3.1.5- Crescimento de <i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853 na ausência (controle) e na presença de diferentes concentrações ($\mu\text{g/mL}$) de ácido ferúlico, do antibiótico cloranfenicol (CLO) (30 $\mu\text{g/mL}$).....	33
Figura 3.1.6 - Crescimento de <i>P. aeruginosa</i> UAlg 114 na ausência (controle) e na presença de diferentes concentrações ($\mu\text{g/mL}$) de ácido ferúlico, do antibiótico cloranfenicol (CLO) (30 $\mu\text{g/mL}$).....	34
Figura 3.2.1- Crescimento de <i>P. aeruginosa</i> DSM 939 na ausência (controle) e na presença de diferentes concentrações ($\mu\text{g/mL}$) de eugenol.....	36
Figura 3.2.2 - Crescimento de <i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853 na ausência (controle) e na presença de diferentes concentrações ($\mu\text{g/mL}$) de eugenol.....	36
Figura 3.2.3- Crescimento de <i>P. aeruginosa</i> UAlg 114 na ausência (controle) e na presença de diferentes concentrações ($\mu\text{g/mL}$) de eugenol.....	37
Figura 3.4.1.1- Colônias de <i>P. aeruginosa</i> DSM 939 e de <i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853 adaptadas ao ácido ferúlico resistentes à ceftriaxona.	40
Figura 3.5.1.1- Atividade antibacteriana do eugenol (3.5.1.1.a)) e da catequina (3.5.1.1.b)) sobre a bactéria <i>Chromobacterium violaceum</i> CV026.....	47
Figura 3.5.2.1 - Degradação de C ₆ -HSL pelo eugenol	48
Figura 3.5.3.1- Avaliação do efeito do eugenol sobre a síntese de AHL por <i>P. aeruginosa</i>	49
Figura 3.6.1 - Sobrevivência das larvas inoculadas com as células adaptadas e não adaptadas de <i>P. aeruginosa</i>	51
Figura 3.6.2 – Melanização em <i>G. mellonella</i> 24 horas após a infecção com as três estirpes de <i>P. aeruginosa</i> adaptadas e não adaptadas ao eugenol	52

Índice de Tabelas

Tabela 1.2-1 Infecções comuns causadas por <i>Pseudomonas</i> e fatores de risco das mesmas. Adaptado de Gellatly & Hancock, (2013)	3
Tabela 1.4-2 - Exemplos de mecanismos de resistência em <i>P. aeruginosa</i> . Adaptado de Gellatly & Hancock (2013).	7
Tabela 2.3.2-3 - Lista de bactérias utilizadas no presente estudo.....	21
Tabela 2.6-4 - Critérios de interpretação dos halos de inibição e respectivas CMIs para os antibióticos testados (CLSI, 2007).	25
Tabela 3.3-5- Valores do aumento da densidade celular* na presença das concentrações sequenciais do eugenol e ácido ferúlico.	39
Tabela 3.4.1-6 – Determinação do perfil de suscetibilidade aos antibióticos das culturas controlo e adaptadas ao ácido ferúlico de <i>P. aeruginosa</i>	41
Tabela 3.4.2-7 - Determinação do perfil de suscetibilidade aos antibióticos das culturas controlo e adaptadas de <i>P. aeruginosa</i> DSM 939 ao eugenol	43
Tabela 3.4.2-8- Determinação do perfil de suscetibilidade aos antibióticos das culturas controlo e adaptadas de <i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853 ao eugenol	44
Tabela 3.4.2-9- Determinação do perfil de suscetibilidade aos antibióticos das culturas controlo e adaptadas de <i>P. aeruginosa</i> UAlg 114 ao eugenol.....	46

Lista de abreviaturas

AHL	Acil Homoserina Lactona
BHI	Brain Heart Infusion
CDC	Centers for Disease Control and Prevention
CIP	Ciprofloxacina
CLO	Cloranfenicol
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
CMB	Concentração Mínima Bactericida
CMI	Concentração Mínima Inibitória
CN	Gentamicina
CRO	Ceftriaxona
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DO	Densidade Ótica
eDNA	DNA extracelular
E	Eritromicina
ESBL	Extended spectrum β -lactamase
ERI	Eritromicina
EUCAST	European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing
FDA	Food and Drug Administration
I	Intermédio
IPM	Imipenem
LB	Luria-Broth
LBa	Luria-Broth agar
MDR	Multi Drug Resistant
MH	Mueller Hinton
MHa	Mueller Hinton agar
MOPS	Glucose (3-(N-morpholino) ácido propano-sulfónico
OE	Óleos essenciais
PBS	Tampão fosfato-salino
PQ	Perceção de quórum

R	Resistente
S	Sensível
UFC	Unidades formadoras de colónias
VA	Vancomicina
XDR	Extensively Drug Resistant

1. Introdução

O uso intensivo e inadequado de antibióticos, quer na terapêutica em humanos quer no âmbito veterinário, tem conduzido ao desenvolvimento de resistências aos agentes antibacterianos o que pode comprometer não só o combate de infeções, bem como muitos procedimentos médicos (Lawrence e Jeyakumar 2013). Por esse motivo tem aumentado a procura de novas terapias antibacterianas. Em virtude deste panorama, várias estratégias têm sido recomendadas para travar o desenvolvimento de resistências, nomeadamente a educação do público, a imposição de regras restritas na prescrição de antibióticos, o melhoramento de estruturas sanitárias, nova avaliação de antibióticos antigos e ou rejeitados, bem como proibir a utilização de antibióticos para fins não terapêuticos, como seja para fins agronómicos e na alimentação de gado, e ainda o desenvolvimento de outras abordagens que possam ajudar a prevenir e até mesmo complementar ou substituir as terapias já existentes em risco de ineficácia (Bush et al. 2011; Carlet et al. 2012; Edwards-Jones 2013). A procura de compostos bioativos de natureza vegetal para combater as multiresistências tem vindo a crescer (Edwards-Jones 2013; M. L. Faleiro e Miguel 2013). Este tipo de compostos traz benefícios óbvios, por um lado são de fácil acesso, por outro lado não são sintéticos e podem inclusivamente apresentar valor nutricional (nutracêuticos), como é o exemplo do mel e produtos derivados (Brudzynski 2006; Miguel et al. 2013). Entre os agentes naturais bioativos que têm sido objeto de estudo podemos destacar as enzimas antimicrobianas, os óleos essenciais e compostos fenólicos naturais, as bacteriocinas e a utilização de bacteriófagos (Abedon et al. 2011; Apolónio et al. 2014; Jeppsson et al. 2011; Marinelli et al. 2012; Sun et al. 2014).

As bactérias Gram negativas são alvo de especial preocupação pois são as que demonstram maior resistência a antibióticos de diferentes classes e são também as responsáveis por um grande número de infeções no ser humano (Fadli et al. 2014). Exemplo disso são as infeções causadas pela bactéria *Pseudomonas aeruginosa* cujo tratamento pode ser limitado acabando por se tornar em infeções crónicas (Gómez e Prince 2007; Wagner e Iglewski 2008). As infeções causadas por esta bactéria têm uma maior incidência a nível hospitalar em doentes imunocomprometidos (Breidenstein et al. 2011; Gellatly & Hancock 2013; Mena & Gerba 2009; Pearson et al. 2000). A crescente incidência deste tipo de infeções assim como a crescente gravidade das mesmas tem sido

alvo de preocupação por parte da comunidade médica e de investigadores (LaBauve e Wargo 2012; Nathwani et al. 2014).

Seguidamente são descritas as principais características da bactéria *P. aeruginosa*.

1.1. Caracterização de *Pseudomonas aeruginosa*

A bactéria *Pseudomonas aeruginosa* é um bacilo aeróbio Gram negativo, ubíquo causador de infeções oportunistas em humanos e com especial relevância em infeções hospitalares (Gellatly e Hancock 2013). Taxonomicamente pertence ao domínio Bacteria, filo Proteobacteria, classe Gammaproteobacteria, ordem Pseudomonadales, família Pseudomonadaceae, género *Pseudomonas* e espécie *P. aeruginosa* (Haynes & Burkholder 1957). O seu comprimento varia entre 1,5 e 5 µm e a largura varia entre 0,5 e 1 µm. Este bacilo tem um flagelo polar que lhe confere mobilidade em superfícies líquidas.

A bactéria *P. aeruginosa* consegue sobreviver a temperaturas entre os 4°C e os 42°C, sendo 37°C a temperatura ótima de crescimento. As culturas de *P. aeruginosa* têm o seu crescimento ótimo em condições aeróbias mas também possuem a capacidade de crescer em anaerobiose desde que exista uma fonte de carbono e um suplemento de nitrato (LaBauve & Wargo 2012). Em condições aeróbias, esta bactéria pode ser cultivada numa grande variedade de meios desde os mais pobres, como MOPS Glucose [3-(N-Morpholino) ácido propano-sulfónico], até aos meios mais ricos, como o meio Luria Broth (LB). Por outro lado, o meio Mueller Hinton (MH) tem sido o meio *standard* usado na técnica de difusão em agar para determinação da suscetibilidade (EUCAST 2015).

1.2. Doenças associadas à bactéria *P. aeruginosa*

Spencer (1996) classificou *P. aeruginosa* como a segunda bactéria patogénica mais frequente a nível europeu e segundo Kanj et al. (2012) é o quinto agente patogénico mais frequente a nível mundial. Esta bactéria patogénica está associada a infeções adquiridas por pacientes com suporte ventilatório ou cateterizados sendo causadora de infeções do aparelho respiratório (responsável por 30% das pneumonias), urinário (responsável por 19% das infeções), em casos de queimaduras e em pacientes com fibrose cística podendo ser fatal (Bodey & Bolivar 1983; Folkesson et al. 2012; Fricks-Lima et

al. 2011; Micek et al. 2015). Contudo, *P. aeruginosa* não surge exclusivamente em ambientes hospitalares e em indivíduos imunocomprometidos. Estima-se que seja responsável por 7% das pneumonias comunitárias (Lister et al. 2009), 90% das endocardites em toxicod dependentes que consomem drogas por via intravenosa (Kanj & Sexton 2012; Mena & Gerba 2009) e 70% das otites e foliculites adquiridas na utilização de equipamentos recreativos balneares (Kerr e Snelling 2009; Mena e Gerba 2009). Tem sido associada a queratites em utilizadores de lentes de contacto e de periodontites (Barbosa et al. 2001; Fleiszig e Evans 2014; Robertson et al. 2011). Segundo Lister et al. (2009), a incidência de *P. aeruginosa* a nível europeu é equiparável à sua incidência nos EUA. Esta bactéria está associada a 21% das pneumonias, 13% das infeções oculares e otorrinolaringológicas, 10% das infeções urinárias e 3% das septicémias ocorridas nas unidades de cuidados intensivos dos EUA.

O facto de *P. aeruginosa* ter a capacidade de infetar zonas distintas do corpo humano (ver Tabela 1.2-1) pode estar ligada à sua elevada versatilidade e flexibilidade metabólica que lhe conferem a capacidade de colonizar e crescer nos mais variados ambientes. Esta flexibilidade torna-a única entre os patogénicos humanos conseguindo infetar uma grande variedade de hospedeiros (desde animais de grande porte até insetos e plantas) (Hardalo e Edberg 1997; LaBauve e Wargo 2012; Liu 1974).

Tabela 1.2-1 Infeções comuns causadas por *Pseudomonas* e fatores de risco das mesmas. Adaptado de Gellatly & Hancock, (2013)

Infeção	Principais fatores de risco
Tecidos moles	Queimaduras, ferimentos não cicatrizados, pós cirurgia
Trato urinário	Uso de cateteres
Bacteremia	Imunocomprometimento
Pé diabético	Diabetes, circulação microvascular debilitada
Trato respiratório/pneumonia	Idade avançada, doença pulmonar crónica obstrutiva, fibrose cística, ventilação mecânica
Otite externa	Ferimento do tecido, bloqueio da água no canal do ouvido
Queratites (infeção da córnea)	Uso prolongado de lentes de contato, contaminação da solução de lentes de contato

1.3. A formação de biofilme por *P. aeruginosa*

Uma das características de *P. aeruginosa*, além da sua ubiquidade, é a sua grande capacidade de crescer em agregados e comunidades sésseis (biofilmes) colonizando, quer equipamentos médicos quer tecidos celulares. A colonização de biomateriais implantados também já foi descrita e é motivo de preocupação (Carmen et al. 2005; Stewart e Costerton 2001). Os biofilmes consistem em agregados densos de células bacterianas que, devido a alterações ambientais, passaram do estado planctónico para células sésseis (aderentes). Após a adesão a uma superfície ocorre a multiplicação das células bacterianas e estas iniciam a produção de uma matriz de exopolissacárideos que as envolve. As camadas mais externas do biofilme são as que se encontram mais expostas aos antibióticos, assim como às defesas do sistema imunitário do próprio hospedeiro. Portanto existe uma proteção das células bacterianas mais internas o que contribui para o aumento da patogenicidade e desenvolvimento de infeções crónicas (Hoiby et al. 2010; Jesaitis et al. 2003). Estas células bacterianas mais internas, que crescem e proliferam sem serem afetadas por agentes externos, podem por vezes adquirir mutações que lhes conferem resistência aos antibióticos (Fonseca et al. 2007; Harmsen et al. 2010) (ver Figura 1.3.1). Estas mutações podem ser acumuladas surgindo isolados resistentes a múltiplas classes de antibióticos (MDR de Multi Drug Resistant) (Pereira et al. 2015). Pereira et al. (2015) seguiram o perfil de resistência de isolados de *P. aeruginosa* num hospital central português e verificaram que 39,9 % dos isolados tinham características MDR e 2,9% tinham características XDR (Extensively Drug Resistant). Outro dado muito preocupante é a tendência futura para uma diminuição dos isolados MDR e um aumento dos isolados XDR, não havendo nenhuma terapêutica disponível neste momento para estes últimos (Pereira et al. 2015).

À medida que o biofilme atinge a sua maturação inicia-se uma fase dispersiva, ou seja, existem células bacterianas com capacidade de se alternarem entre a fase sésseis para uma fase planctónica desconectando-se do biofilme e dispersando pelo ambiente. Esta fase de dispersão permite a aderência de células bacterianas a novas superfícies recomeçando o ciclo de formação de biofilme (Gellatly e Hancock 2013; McDougald et

al. 2011). Assumindo que algumas dessas células bacterianas dispersivas adquiriram algum tipo de resistência antimicrobiana, enquanto viviam em biofilme, qualquer célula bacteriana que derive destas terá também o mesmo tipo de resistência dando origem a colônias resistentes.

A formação de biofilme é um processo rápido e muito eficiente de tal modo que evita a morte de uma população bacteriana perante um fator ambiental externo adverso (de la Fuente-Núñez et al. 2013). Este modo de vida confere maior capacidade de sobrevivência face a fatores ambientais extremos sendo também importante no estabelecimento de infecções (de la Fuente-Núñez et al. 2013; Gellatly & Hancock 2013) e está relacionado com a persistência da bactéria em infecções crônicas (Aaron et al. 2002; de la Fuente-Núñez et al. 2013; Jesaitis et al. 2003; Stewart & Costerton 2001). Devido à elevada dificuldade no tratamento destas infecções, a remoção do tecido infetado ou do próprio implante tem sido a solução adotada até aos dias de hoje (Hoiby et al. 2010).

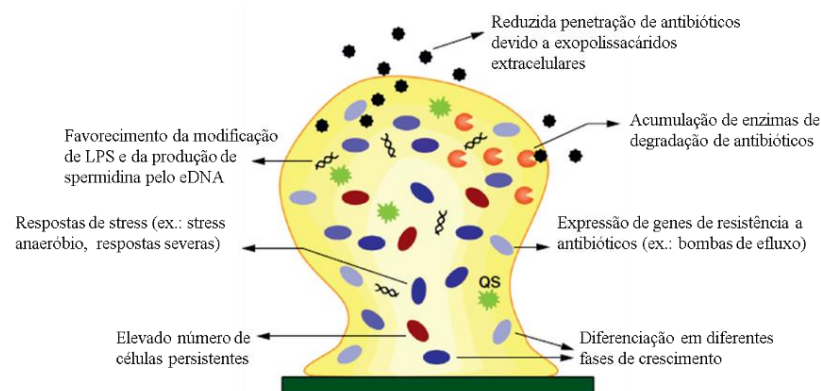


Figura 1.3.1- Representação esquemática de um biofilme de *P. aeruginosa* com exemplos de mecanismos de resistência adaptativa adquiridos durante o crescimento. Abreviaturas: QS – Quorum-sensing (perceção de quórum); eDNA – DNA extracelular. Adaptado de de la Fuente-Núñez et al. 2013.

1.4. O desenvolvimento de resistências aos antibióticos por *P. aeruginosa*

A bactéria *P. aeruginosa* pode, por vezes, adquirir resistência a um antibiótico durante o próprio tratamento o que vem dificultar o controlo da infeção. É importante considerar ainda a contínua pressão seletiva a que esta bactéria (entre outras) está sujeita, em ambiente hospitalar, promovendo o desenvolvimento de resistências, quer seja por aquisição de mutações ou pela transferência horizontal de genes (Agents et al. 2001; Gellatly e Hancock 2013). Existem três tipos de resistências descritas em bactérias: as

intrínsecas, que são codificadas pelo cromossoma bacteriano; as adquiridas, que resultam da transferência genética ou de mutações; e as adaptativas, que surgem perante fatores ambientais externos adversos causando uma mudança na expressão de genes (Gellatly e Hancock 2013) (Tabela 1.4-2). Estes três tipos de resistência já foram todos descritos em *P. aeruginosa* e por vezes ocorrem em simultâneo no mesmo isolado (Gellatly e Hancock 2013). A baixa permeabilidade da membrana externa (devido à perda das proteínas purinas OprD), a expressão constitutiva de bombas de efluxo membranares (Mex) e a produção de enzimas de degradação de antibióticos (ex.: β -lactamase) são exemplos de resistências intrínsecas (Soto 2013; Strateva & Yordanov 2009) (Figura 1 e Tabela 2). Por vezes pode ocorrer a transferência de resistência a um ou mais antibióticos entre diferentes bactérias. Esta transferência pode ser feita por conjugação, transformação ou transdução através da transmissão de plasmídeos ou transposões que conferem resistência à bactéria recetora. Este tipo de resistência insere-se no grupo das resistências adquiridas de onde também fazem parte as mutações. Exemplo disso são as mutações ao nível da DNA girase que levam a uma redução da afinidade de ligação da enzima com as fluoroquinolonas tornando as bactérias possuidoras desta mutação resistentes a antibióticos desta classe (Breidenstein, de la Fuente-Núñez, e Hancock 2011; Schweizer 2003). Também as mutações num gene regulador podem conduzir à desregulação de um mecanismo de resistência pré-existente (intrínseco), como por exemplo uma mutação ao nível do gene *mexZ*. O gene *mexZ* em condições normais reprime a expressão do gene *mexXY*, portanto uma mutação ao nível do gene *mexZ* terá como consequência a sobre expressão da bomba de efluxo MexXY promovendo o efluxo de antibióticos β -lactâmicos, entre outros (Matsuo et al. 2004). Além das resistências intrínsecas e das adquiridas podem ainda ocorrer resistências adaptativas como consequência da exposição a condições de *stress* (ex.: exposição a concentrações de antibiótico sub-inibitórias) ou como consequência de diferentes fases de crescimento bacteriano (ex. células em fase estacionária e células em biofilme) (Gellatly e Hancock 2013). Estes fatores conduzem a alterações na expressão genética sendo exemplo disso a resistência a péptidos catiónicos antimicrobianos. Quando a bactéria se encontra sob certas condições de *stress* uma variedade de cinases regula positivamente a expressão do operão *arnBCADTEF-ugd* pelo que ocorre síntese e adição de aminoarabinose ao lípido A. Esta alteração na expressão genética tem como consequência a diminuição da interação destes péptidos antimicrobianos com a membrana externa através da redução da carga negativa dos lipopolissacarídeos (McPhee et al. 2003; MCPhee et al. 2006) (ver Tabela 1.4-2).

Todos os mecanismos de resistência acima descritos conferem à bactéria *P. aeruginosa* um perfil de resistência a várias classes de antibióticos. Atualmente os antibióticos da classe dos β -lactâmicos, aminoglicosídeos e fluoroquinolonas são os mais prescritos no tratamento de infecções por *P. aeruginosa*, no entanto esta bactéria desenvolveu alguns sistemas de resistência aos mesmos (já descritos anteriormente) (Tabela 1.4-2).

Tabela 1.4-2 - Exemplos de mecanismos de resistência em *P. aeruginosa*. Legenda: Mex- bombas de efluxo; Opr- proteínas que formam canais de porinas na membrana externa; ESBL – extended spectrum β -lactamase. Adaptado de Gellatly & Hancock (2013).

Mecanismo	Tipo de resistência	Exemplo (s)
Bombas de efluxo	Intrínseca	MexAB-OprM, MexCD-OprJ, MexEF-OprN, MexXY-OprM (cefalosporinas, carbapenemes, aminoglicosídeos, quinolonas)
Impermeabilidade da membrana externa	Intrínseca	OprF, OprD, OprB (carbapenemes, aminoglicosídeos, quinolonas)
β -lactamases	Intrínseca	AmpC (penicilinas)
Mutações direcionadas	Adquirida	DNA girase, DNA topoisomerase (quinolonas) MexZ (quinolonas, cefapimes, aminoglicosídeos)
Transferência horizontal	Adquirida	Metalo- β -lactamases, ESBLs (penicilinas, cefalosporinas, carbapenemes)
Alterações membranares	Adaptativa	Modificação do lípido A (aminoglicosídeos, polimixinas) Regulação positiva AmpC (penicilinas)

Tendo em conta todos estes fatores preocupantes, torna-se importante e necessária a procura de novos compostos que apresentem atividade biológica e que possam ser usados, quer como complementos da antibioterapia quer isoladamente, no controlo do crescimento e da virulência bacteriana.

1.5. O sistema de percepção de quórum de *P. aeruginosa*

O perfil invasivo e persistente de *P. aeruginosa* está ligado à sua elevada capacidade de adaptação permitindo a colonização rápida de diferentes ambientes. *P. aeruginosa* desenvolveu uma complexa rede de sinalização regulatória que detecta e reage a moléculas endógenas e extracelulares dependendo da densidade populacional que desencadeiam alterações ao nível da expressão genética. Este sistema é denominado de percepção de quórum (PQ). A molécula *N*-Acil Homoserina Lactona (AHL) (autoindutor) foi das primeiras moléculas de sinal a serem identificadas e têm sido também as mais estudadas (Nadal Jimenez et al. 2012). Deste modo as AHLs são moléculas sinal utilizadas como forma de comunicação célula a célula pelas bactérias Gram negativas. Depois de sintetizadas são libertadas para o meio extracelular onde são reconhecidas por recetores de outras bactérias da mesma espécie/estirpe. Estas moléculas são sintetizadas por proteínas da família LuxI e são reconhecidas por reguladores de transcrição da família LuxR (Figura 1.5.1). Quando é atingido um limite de concentração de AHLs (correlacionado com a densidade populacional) estas moléculas formam um complexo com o regulador transcricional LuxR permitindo a ligação ao DNA o que conduz a alterações na expressão de múltiplos genes de virulência entre outros (Bassler 1999; Hentzer et al. 2003; Smith et al. 2002). O aumento da densidade populacional é acompanhado por um aumento da concentração de AHLs sendo uma forma de monitorização da densidade populacional (Figura 1.5.1). Por este motivo estas moléculas sinal têm um papel importante na diferenciação do biofilme e na expressão de fatores de virulência, processos estes relacionados com a densidade populacional (Jakobsen et al. 2013; Norizan et al. 2013; Smith et al. 2002).

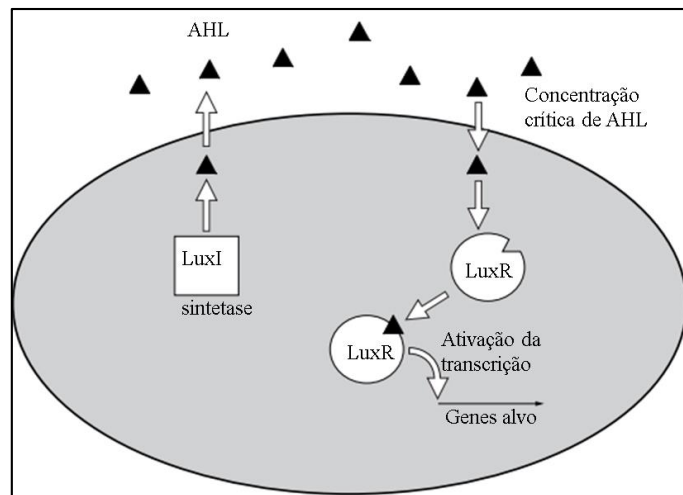


Figura 1.5.1 – Representação esquemática do sistema de PQ LuxI/LuxR comum à maioria das bactérias Gram negativas. Adaptado de Bassler (1999).

P. aeruginosa tem dois sistemas de AHLs bem estudados, o sistema Las e o sistema Rhl (ver Figura 1.5.2). O sistema Las produz, através da sintetase LasI, e responde, através do recetor LasR, ao auto-indutor *N*-3-oxo-dodecanoil homoserina lactona (3-oxo-C₁₂-HSL). Este sistema controla a produção de múltiplos fatores de virulência (ex.: elastases LasA e LasB, exotoxina A e protease alcalina) envolvidos em infeções agudas e em danos nas células hospedeiras. O sistema Rhl produz, através da sintetase RhlI, e responde, através do recetor RhlR, ao auto-indutor *N*-butanoil homoserina lactona (C₄-HSL). Este sistema induz a expressão de genes responsáveis pela produção de ramnolípido e reprime a expressão de genes responsáveis pela função do sistema de secreção tipo III (T3SS). Este sistema de secreção permite a libertação de proteínas tóxicas para o citoplasma de células eucariotas sendo determinante na virulência de infeções em humanos. Existe uma relação hierárquica entre o sistema Las e o sistema Rhl sendo o complexo 3-oxo-C₁₂-HSL—LasR o que regula positivamente a transcrição de rhlR pelo que quando o sistema Las é ativado irá ativar posteriormente o sistema Rhl.

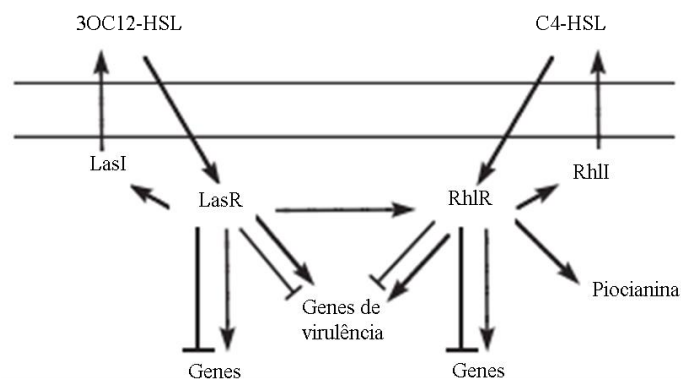


Figura 1.5.2 – Representação esquemática dos sistemas de PQ Las e Rhl em *P. aeruginosa*. Adaptado de O’Loughlin et al. (2013).

O papel destes dois sistemas no perfil de virulência de *P. aeruginosa* já foi descrito em estudo anteriores (Jimenez et al. 2012; Pearson et al. 2000; Zhu et al. 2015). Estudos realizados em ratinhos revelaram que quer a deleção das sintetases de AHLs, quer os seus recetores conduziu a uma diminuição da gravidade da infeção (Pearson et al. 2000; Smith et al. 2002). Smith et al. (2002) verificaram ainda que os sistemas de PQ de *P. aeruginosa* têm um papel na sua patogénese não só através da regulação da expressão de fatores de virulência (exoenzimas e toxinas), mas também através da indução da inflamação que ocorre através das interações entre as AHLs e as células eucariotas.

O modo como o sistema de PQ atua sobre a formação de biofilme ainda não é claro. Davies (1998) testou a estirpe de *P. aeruginosa* PAO1 mutante em *lasI* e verificou que o biofilme formado por esta tinha uma estrutura distinta quando comparado com o biofilme formado pela estirpe selvagem. Noutro estudo Shrouf et al. (2006) estabeleceram uma relação entre as condições nutricionais e o sistema de perceção de quórum avançando com a hipótese de que as condições ambientais podem ditar quando o sistema é importante no desenvolvimento de biofilme. Segundo este estudo, os sistemas de PQ mostraram-se necessários à formação de biofilme em alguns meios de cultura suplementados com diferentes fontes de carbono (ex.: succinato), mas não em outros (ex.: glucose ou glutamato). Estes dados justificam de certa forma a incoerência de resultados obtidos ao longo dos anos com as diferentes condições de cultura utilizadas entre estudos assim como diferentes condições ambientais.

Este meio de comunicação bacteriano controla “comportamentos sociais” bacterianos tais como o crescimento, a virulência e a capacidade de aderência/formação de biofilme (direta ou indiretamente). Qualquer interferência ao nível do sistema de PQ

irá afetar diretamente os processos dele dependentes num efeito em cascata. É nesse sentido que a busca de novos compostos antibacterianos tem sido direcionada, ou seja, para compostos que atuem ao nível do processo chave, o sistema de percepção de quórum.

1.6. Os fatores de virulência de *P. aeruginosa*

Dependendo das condições de crescimento estima-se que entre 4 a 6% do total de genes de *P. aeruginosa* sejam controlados por PQ (Schuster et al. 2003). Dentro desta percentagem incluem-se genes que codificam fatores de virulência tais como proteases, elastases, exoenzimas, sideróforos (ex.:piocianina) e ramnolípidos (Jakobsen et al. 2013). As proteases são enzimas conhecidas por degradar imunoglobulinas e fibrina em infecções oculares e casos de septicemia, mas também por danificar outros tecidos, como no caso de infecções respiratórias (Gellatly e Hancock 2013). LasA e LasB são dois exemplos de elastases reguladas pelo sistema de percepção de quórum Las que digerem elastina (uma proteína fibrosa). Dentro das exoenzimas é possível destacar as lipases e fosfolipases que quebram lípidos e fosfolípidos superficiais nas membranas celulares do hospedeiro (Gellatly e Hancock 2013). Os sideróforos são outro fator de virulência produzido por *P. aeruginosa* de onde se destacam a piocianina. A piocianina é um pigmento azul-esverdeado conhecido por causar *stress* oxidativo nas células hospedeiras por meio da interrupção da produção de catalase e do transporte de elétrons mitocondrial (Lau et al. 2004). Os ramnolípidos são um outro fator de virulência produzido por *P. aeruginosa* que têm como função lisar neutrófilos, macrófagos e diferentes células animais estando também envolvidos na mobilidade da bactéria (Jakobsen et al. 2013).

1.7. Modelos animais da infecção por *P. aeruginosa*

O corpo humano, o sistema imunitário e as interações com as bactérias invasoras são sistemas de uma elevada complexidade tornando o uso de modelos animais necessário à compreensão da patogénese e da interação dos compostos bioativos com a bactéria e com o ser humano e o seu sistema imunitário. Contudo, o uso de animais em testes *in vivo* deve ser bem justificado e a ética subjacente a este tipo de práticas tem sido alvo de debate

durante anos. Estes modelos animais são essenciais como forma de validação da eficácia de compostos antimicrobianos.

O ratinho tem sido o modelo animal mais usado em estudos *in vivo* devido a uma variedade de fatores favoráveis (Van Heeckeren et al. 1997; Hentzer et al. 2003; Pearson et al. 2000; Stieritz & Holder 1975). O facto de serem suscetíveis a uma gama de infeções microbianas semelhante aos humanos e de possuírem um sistema imunitário que mimetiza o do ser humano torna-os no principal modelo animal experimental no estudo de mecanismos de infeção e de imunidade (Buer e Balling 2003). Pavlovskis & Wretling (1979) utilizaram ratinhos como modelo experimental no estudo de infeções crónicas e agudas causadas por *P. aeruginosa* em queimaduras. No entanto, o uso do ratinho apresenta aspetos polémicos, pois surgem questões do âmbito ético, bem como questões económicas, pois requerem a existência de infraestruturas e de fundos significativos (Ramarao et al. 2012).

Mais recentemente, Zhu et al. (2015) utilizou o nemátodo *Caenorhabditis elegans* como modelo para testar os efeitos do bloqueio do fator de virulência LasB de *P. aeruginosa*. Atualmente, não existe nenhum modelo animal ideal, sendo necessário compreender as vantagens e desvantagens de cada modelo disponível para selecionar o mais adequado ao tipo de estudo que se pretende realizar (Ramarao et al. 2012).

O modelo da larva da cera (*Galleria mellonella*) tem sido recentemente explorado no estudo de interações entre o agente patogénico e o hospedeiro, incluindo *P. aeruginosa*, (Apolónio et al. 2014; Giannouli et al. 2014; Hill et al. 2014). Esta larva possui um sistema circulatório e uma complexa resposta do sistema imunitário inato, mimetizando a resposta do sistema imunitário humano. Esta é uma particularidade muito importante em estudos farmacocinéticos, pois um fármaco não pode ser comercializado se este representar toxicidade para o ser humano (Aperis et al. 2007; Jander et al. 2000; Mylonakis et al. 2005; Peleg et al. 2009). Além disso, é um ser vivo simples, fácil de manusear e de manter em laboratório (o que o torna economicamente viável) e que não levanta questões éticas, tornando-o ideal para estudos de patogenicidade iniciais *in vivo* (Hill et al. 2014). Estas larvas são injetadas diretamente com o inóculo reduzindo o erro técnico e havendo um maior controlo da dose de inóculo a que a larva é sujeita.

1.8. Utilização de compostos naturais no combate a resistências aos antibióticos

Um dos aspectos que atualmente desperta a atenção dos investigadores é a possibilidade de os compostos naturais contribuírem para o desenvolvimento de resistência aos agentes antimicrobianos, em especial se utilizados de modo continuado (Hammer et al. 2012; Apolónio et al. 2014). Apolónio et al. (2014) avaliou o efeito da adaptação de *Staphylococcus aureus* e de *Listeria monocytogenes* ao eugenol e ao citral obtendo resultados bastante promissores. Estes dois compostos constituintes de OE revelaram ser muito eficazes na inibição da formação de biofilme assim como tiveram um efeito sobre o potencial de virulência das duas espécies bacterianas em estudo. Este tipo de resultados apoia o potencial que os compostos bioativos podem constituir, seja como alternativa ou como complemento à antibioterapia, e justifica o investimento em estudos nesse sentido.

Os compostos bioativos podem ser metabolitos primários ou metabolitos secundários. Nos metabolitos secundários presentes nas plantas incluem-se os compostos fenólicos, terpenoides, alcalóides, entre outros. Estes podem atuar a concentrações sub-inibitórias do crescimento bacteriano, afetando a capacidade de aderência e de virulência das bactérias patogénicas, o que contribui para uma redução da pressão ambiental sobre os microrganismos dificultando o desenvolvimento de resistências ao mesmo tempo que afetam as suas principais características (Apolónio et al. 2014). O principal objetivo tem sido incluir estes compostos em filmes biodegradáveis como proteção dos alimentos (Antunes et al. 2012), existindo já estudos nesse sentido que utilizam o ácido gálico em filmes de quitosano (Sun et al. 2014) e o ácido ferúlico como composto de conservação de saladas e salmão fumado para prevenir contaminações por *L. monocytogenes* (Takahashi et al. 2015). Teixeira et al. 2014 sugere ainda o reaproveitamento de resíduos alimentares, mais concretamente de resíduos da produção de vinhos, devido às suas propriedades antibacterianas provavelmente devido ao seu elevado teor em polifenóis. Também o extrato de chá verde, por ter uma composição rica em polifenóis, mostrou ter poder inibitório no crescimento da estirpe *P. aeruginosa* ATCC 27853 com uma concentração mínima inibitória (CMI) de 800 µg/ml e um halo de inibição de 17,550 ± 0,3939 mm. A atividade de 16 µg de chá verde foi até comparável à atividade de 10 µg de gentamicina comercial. Além disso, o chá verde revelou ter também um efeito sinérgico quando utilizado juntamente com antibióticos β-lactâmicos contra estirpes MRSA (Radji et al. 2013). A atividade do extrato de chá verde foi justificada devido ao

seu efeito anti-aderência (inibiu a aderência de bactérias à membrana celular do hospedeiro) e por ter afetado a atividade da enzima dihidrofolato reductase, enzima necessária à síntese de purina e pirimidina. Extratos de folhas de oliveira também revelaram ter efeito inibitório sobre o crescimento de bactérias Gram positivas (*Bacillus cereus*, *B. subtilis*, *S.s aureus*), Gram negativas (*Escherichia coli*, *P. aeruginosa* e *Klebsiella pneumoniae*) e de fungos (*Candida albicans* e *Cryptococcus neoformans*) (Pereira et al. 2007). A inibição do crescimento destes microrganismos foi dependente da concentração do extrato e da sua composição em fenóis (Pereira et al. 2007). Existem ainda alguns compostos que já foram identificados como bloqueadores da percepção de quórum, tais como algumas furanonas sintéticas (C-30 e C-56) (Hentzer et al. 2003), a iberina extraída do rábano (Jakobsen et al. 2012) e ajoeno extraído do alho (*Allium sativum*) (Jakobsen et al. 2012).

Estudos como estes demonstram a enorme diversidade de fontes de compostos naturais com possível bioatividade. A fácil acessibilidade a estes compostos aliada ao fato de serem biologicamente ativos e ao mesmo tempo alguns deles terem valor nutricional (nutracêuticos) torna-os compostos de elevado interesse científico e económico.

1.8.1. Compostos bioativos de *Arbutus unedo*

Vários estudos indicam que o medronheiro (*Arbutus unedo*) tem um grande potencial como fonte de compostos com atividade biológica (Miguel et al. 2014; Malheiro et al. 2012). Esta árvore frutífera tem sido utilizada na medicina popular (folhas e frutos) assim como no fabrico de bebidas alcoólicas (fruto) mas tem sido usada muito raramente na alimentação (Miguel et al. 2014). A grande maioria dos trabalhos científicos até hoje publicados, que se debruçaram sobre este assunto centrou-se no uso de extratos de folhas de medronheiro (Andrade et al. 2009; Malheiro et al. 2012) ignorando o potencial do medronho (fruto). Relativamente ao medronho já foi demonstrado que este tem atividade antioxidante (Andrade et al. 2009; Fortalezas et al. 2010; Heinonen 2007; Malheiro et al. 2012; Ruiz-Rodríguez et al. 2014) e alguns resultados preliminares sugerem que tem também atividade antimicrobiana (Fortalezas et al. 2010). Esta atividade antimicrobiana pode dever-se ao seu perfil químico que é constituído por uma percentagem considerável de compostos fenólicos (Fortalezas et al. 2010; Miguel et al. 2014).

Os compostos fenólicos são metabolitos secundários produzidos por plantas superiores e que em alguns casos já foram comprovadas as suas capacidades terapêuticas no ser humano tais como: antioxidantes, antialérgicos, anti-inflamatórios, anticancerígenos, anti-hipertensivos, antivirais e antifúngicos (Daglia 2012; Fortalezas et al. 2010; Heinonen 2007; Manach et al. 2004; Szajdek e Borowska 2008).

1.8.1.1. Propriedades antibacterianas do ácido gálgico

O ácido gálgico (Fig. 1.8.1.1.1) tem sido referido como o composto fenólico maioritário em tratos de medronho, embora o ácido ferúlico também seja encontrado numa percentagem considerável (Miguel et al. 2014; Ruiz-Rodríguez et al. 2014). Estudos anteriores referem que estes dois ácidos fenólicos inibem ou diminuem a formação de biofilme em várias bactérias patogénicas tais como *P. aeruginosa*, *S. aureus* e *L. monocytogenes* (Borges et al. 2012). O ácido gálgico já é atualmente utilizado como antifúngico (Nohynek et al. 2006). É um fitoquímico bioativo presente na dieta humana, pelo que é considerado seguro. Em estudos anteriores demonstrou ter atividade antimicrobiana contra *Salmonella* Typhimurium, *E. coli*, *S. aureus* e *Campylobacter jejuni* (Sarjit et al. 2015). Um dos possíveis mecanismos de ação que tem sido descrito centra-se na lipofilidade dos compostos fenólicos e que devido a essa característica estes compostos têm a capacidade de abrir canais de efluxo na membrana bacteriana (Borges et al. 2013; Campos et al. 2009). Mais recentemente, Sarjit et al. (2015) verificou que o efeito bactericida do ácido gálgico não era resultado da perda de conteúdo celular ou de mudanças morfológicas da membrana, mas sim de uma perda de iões cálcio que consequentemente provocou a degradação do DNA causando danos celulares ou até mesmo morte celular em *Campylobacter coli*. No mesmo estudo foi ainda verificado que o ácido gálgico tem atividade bacteriostática contra estirpes de *C. jejuni* e *C. coli*.

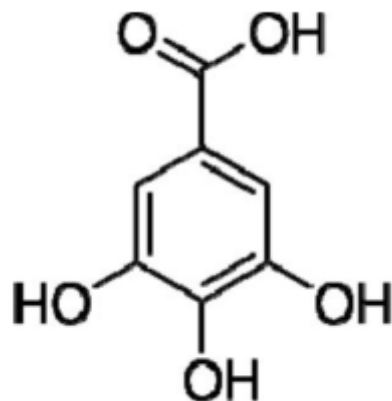


Figura 1.8.1.1.1 – Estrutura química do ácido gálgico.

1.8.1.2. Propriedades antibacterianas do ácido ferúlico

O ácido ferúlico (Fig. 1.8.1.2.1) pertence à família dos ácidos fenólicos e deriva do ácido cafeico. É um composto muito abundante em frutos e vegetais e um dos componentes maioritários de algumas plantas utilizadas na medicina chinesa (Ou e Kwok 2004). Vários estudos referem o ácido ferúlico como um composto bioativo destacando a sua atividade como antioxidante, anticancerígeno, antifúngico, anti-inflamatório e antiviral (Ou e Kwok 2004; Mancuso e Santangelo 2014; Daglia 2012). Segundo os resultados obtidos por Takahashi et al. (2015), o ácido ferúlico tem atividade antibacteriana muito forte sobre *L. monocytogenes*, inibindo o seu crescimento com um risco mínimo de desenvolvimento de resistências ao composto.

Uma das hipóteses apresentadas por Campos et al. (2009) como possível mecanismo de ação do ácido ferúlico é a sua ação inibitória do crescimento bacteriano, primeiro através da promoção do influxo de prótons para o meio intracelular, e depois através do efluxo de iões potássio para o meio extracelular. Por outro lado, Borges et al. (2013) apresentaram uma outra alternativa para o modo de ação deste composto. Segundos estes autores, o ácido ferúlico, por ser um composto electrofílico, tem a capacidade de interagir com a superfície membranar bacteriana de modo a aumentar a solubilidade lipídica e dessa forma transpor a camada lipídica bacteriana atuando sobre os constituintes citoplasmáticos.

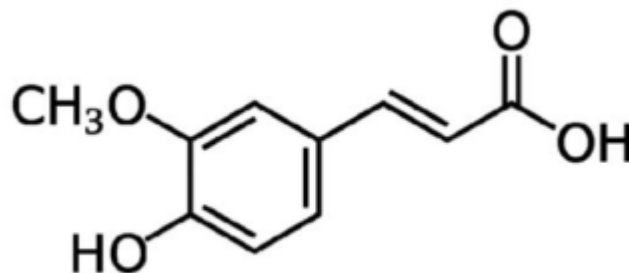


Figura 1.8.1.2.1– Estrutura química do ácido ferúlico.

1.8.2. Propriedades antibacterianas do Eugenol

O eugenol (4-alil-2-metoxifenol) (Fig. 1.8.2.1) é um fenilpropanoide com atividade antimicrobiana comprovada (Apolónio et al. 2014; Ali et al. 2005; Gill e Holley 2004; Walsh et al. 2003). À exceção dos trabalhos desenvolvidos por Apolónio et al. (2014), foram raros os que tiveram em consideração o possível efeito que a exposição prolongada a este composto pode ter em bactérias patogénicas como *S. aureus* e *L. monocytogenes*.

Este fenilpropanoide pode ser extraído do cravo-da-índia (Walsh et al. 2003) e tem sido utilizado como analgésico, anestésico local, anti-inflamatório, antibacteriano e na medicina dentária. Nos EUA a organização Food and Drug Administration (FDA) reconhece-o como um composto seguro, pelo que pode ser usado e consumido pelo Homem. Na Europa é igualmente aceite a sua utilização como composto aromatizante em produtos alimentares (Regulamento EU 872/2012). Pensa-se que terá como modo de ação a desintegração da membrana bacteriana (*P. aeruginosa* NCIM 5029 exposta a 20 mM de eugenol perdeu cerca de 50% da integridade membranar). Outros estudos (Hemaiswarya & Doble 2009; Walsh et al. 2003) também já tinham apontado danos a nível da membrana como possível mecanismo de ação do eugenol. Hemaiswarya & Doble (2009) demonstraram ainda que os danos ao nível da membrana aumentaram a permeabilidade não seletiva da membrana. Este modo de ação é consistente com a sinergia que o eugenol tem com os antibióticos. A desintegração da membrana facilita a entrada dos antibióticos para o meio intracelular promovendo a atividade dos mesmos. Hemaiswarya & Doble (2009) verificaram também que antibióticos não específicos para

bactérias Gram negativas, tais como a vancomicina e oxacilina, se tornaram mais eficazes no combate das mesmas quando estas bactérias foram previamente expostas ao eugenol.

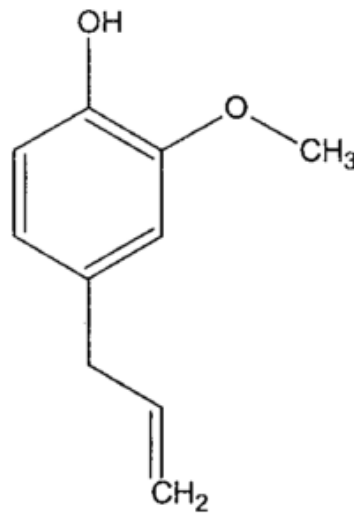


Figura 1.8.2.1 – Estrutura química do eugenol.

1.9. Objetivos

Estudos anteriores têm evidenciado o potencial dos compostos bioativos como agentes antimicrobianos, contudo é necessário avaliar o efeito dos mesmos a longo prazo. Será que podem ser usados como alternativa à antibioterapia ou devem ser usados em conjunto de forma a aumentar a eficácia do tratamento? Da mesma forma que as bactérias têm adquirido resistências aos antibióticos será que é possível que aconteça o mesmo com os compostos bioativos de origem vegetal?

Considerando as questões aqui levantadas, no presente trabalho pretendeu-se:

1) Verificar se os ácidos gálico, ferúlico e o eugenol tinham atividade antibacteriana sobre três estirpes de *P. aeruginosa*. Foi realizada a determinação da concentração mínima inibitória (CMI) e da concentração mínima bactericida (CMB);

2) Avaliar o potencial anti PQ afetando, por sua vez, a capacidade de formação de biofilme e o potencial de virulência;

3) Analisar o efeito da exposição contínua da bactéria a estes compostos na suscetibilidade aos antibióticos usados na terapia de infeções causadas por *P. aeruginosa*.

Este estudo foi realizado no Laboratório de Microbiologia do Centro de Investigação Biomédica da Universidade do Algarve (CBMR-UALG).

2. Material e Métodos

2.1. Equipamentos

Agitador magnético com aquecimento Agimatic-E (Selecta, Espanha)
Autoclave Uniclave88 – 44x60 (AJC, Lisboa, Portugal)
Balança analítica XS-410 (Fisher Scientific, USA)
Balança analítica AE 200 (Mettler, Suíça)
Banho-maria SW 22 (Julabo, Alemanha)
Câmara de Fluxo Laminar Bio48 (Faster, Itália)
Centrifugadora refrigerada – Mikro 22R (Hettich, Reino Unido)
Congelador ultra low temperature freezer -80°C U725 (Innova New Brunswick Scientific, EUA)
Espectrofotómetro Novaspec®II (Amersham Pharmacia Biotech, Espanha)
Incubadora Raypa, 30°C (Selecta, Espanha)
Incubadora 37°C (Binder, EUA)
Leitor de microplacas Tecan Infinite M200 (Tecan, Áustria)
Microscópio ATC 2000 (Leica, Portugal)
Termociclador Biometra (Alfa gene)
Vortex L46 (Labinco, Holanda)
Vortex PCV-3000 (Grant-Bio, Letónia)

2.2. Meios de cultura

- Agar infusão de cérebro e coração, BHI (do inglês, Brain Heart infusion) (Biokar Diagnostics, Beauvais). Preparado de acordo com as instruções do fabricante, com adição de 1,5% (p/v) de agar (VWR, EUA).

- Agar Mueller-Hinton, MHB (do inglês, Mueller-Hinton Broth) (Oxoid, Inglaterra). Preparado de acordo com as instruções do fabricante, com adição de 1,5% (p/v) de agar (VWR, EUA).

- Agar Luria Broth, LBB (do inglês, Luria Broth Base) (Sigma). Preparado de acordo com as instruções do fabricante, com adição de 1,5% (p/v) de agar (VWR, EUA).

Os mesmos meios de cultura em caldo foram preparados sem adição de agar. A esterilização de todos os meios foi realizada por autoclavagem (120°C durante 20 minutos).

2.3. Material Biológico

2.3.1. Componentes do extrato de *A. unedo* e de óleo essencial de cravinho

Neste estudo foram utilizados dois componentes de extrato de *A. unedo*, o ácido ferúlico (Sigma-Aldrich) e o ácido gálgico (Sigma-Aldrich). Para cada um deles foi preparada uma solução *stock* em etanol e PBS (1:1), solução essa que foi mantida a 5°C por um período máximo de 48 h até à sua utilização conforme indicado pelo fabricante. Foi utilizado também o componente maioritário do óleo essencial de cravinho, o eugenol (99%, Fluka). A solução *stock* de eugenol foi preparada a 160 mM em 2-isopropanol e foi mantida a -20°C por um período não superior a 15 dias conforme indicado pelo fabricante.

2.3.2. Bactérias

Neste estudo foram utilizadas duas estirpes de coleção, *P. aeruginosa* DSM 939 e *P. aeruginosa* ATCC 27853 e uma estirpe isolada de uma amostra de água (Tabela 2.3.2 1). As células bacterianas foram mantidas a -80°C em meio BHI suplementado com 25% (v/v) de glicerol. A recuperação das células de *P. aeruginosa* foi realizada em meio MH com uma incubação a 37°C e as células de *Chromobacterium violaceum* em meio LB com uma incubação a 30°C durante 24 h.

Tabela 2.3.2-3 - Lista de bactérias utilizadas no presente estudo.

Bactéria	Descrição	Fonte
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	Isolada de hemocultura, estirpe de referência em testes de suscetibilidade aos antibióticos	Coleção de Culturas Tipo Americana
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> DSM 939	Isolada de água de garrafa de compartimento animal	Coleção de Culturas Tipo Alemã
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> UAlg 114	Isolada de água	Coleção do Laboratório de Microbiologia, CBMR
<i>Chromobacterium</i> <i>violaceum</i> CV026	Estirpe indicadora de produção de <i>N</i> -acil homoserinas lactonas (Hg ^R , <i>cvil</i> ::Tn5 <i>xyIE</i> , Kan ^R , mais resistência expontânea Str ^R)	Oferta do Prof. Mondher El Jaziri da Universidade Livre de Bruxelas, Bélgica. (Mcclean et al. 1997)

CBMR, Centro de Investigação em Biomedicina da Universidade do Algarve

2.4. Determinação dos valores de Concentração Mínima Inibitória e Concentração Mínima Bactericida

De modo a avaliar a atividade antimicrobiana dos compostos em estudo procedeu-se à determinação dos valores de Concentração Mínima Inibitória (CMI) e Concentração Mínima Bactericida (CMB) de acordo com o (Apolónio et al. 2014) . A CMI traduz-se pela quantidade mínima de agente antimicrobiano necessário à inibição do crescimento de um microrganismo num dado período de tempo, contudo é possível a recuperação das células quando transferidas para meio sólido. A CMB corresponde ao valor mínimo onde para além de se ter registado a ausência de crescimento não ocorreu a recuperação das células em placas de MHa (Faleiro et al. 2005).

Existem vários métodos que podem ser utilizados na determinação da CMI e da CMB contudo ainda não existem métodos padronizados para a avaliação da atividade antimicrobiana de compostos naturais *in vitro*. Os métodos existentes destinam-se à avaliação da atividade de antibióticos e têm sido adaptados aos compostos naturais

(Apolónio et al. 2014; Burt, 2004; Faleiro et al. 2005; Faleiro, 2011). Dos métodos disponíveis destaca-se o método de difusão em agar e os métodos de diluição em agar e em meio líquido (microdiluição e macrodiluição) (EUCAST CLSI).

Neste estudo recorreu-se ao método de microdiluição em meio líquido de acordo com a metodologia descrita em Faleiro et al. (2005). As estirpes de *P. aeruginosa* foram repicadas em placas de Petri com meio MHa a 37°C durante 24 h. A partir desta cultura preparou-se o pré-inóculo transferindo uma ansada da cultura para 10 mL de caldo MH. A incubação decorreu a 37°C com agitação (120 rpm) durante a noite. Foram transferidos 100 µL de cultura para um tubo *eppendorf* (por réplica e por concentração a testar) procedendo-se de seguida a uma centrifugação a 2790 x g durante 5 minutos a 4°C. Finda a centrifugação removeu-se o sobrenadante e colocou-se imediatamente o tudo em gelo de forma a inibir o crescimento microbiano. A cada tubo *eppendorf* foi adicionado 100 µL do meio de cultura com o composto a testar na respetiva concentração (ácido gálgico, ácido ferúlico ou eugenol). Preencheu-se cada poço de uma microplaca estéril de 96 poços de fundo plano (Greiner) com 180 µL de caldo MH suplementado com a concentração correspondente de cada composto a testar. Procedeu-se à inoculação dos poços com 20 µL de suspensões bacterianas previamente preparadas, em caldo MH suplementado com a concentração apropriada de cada composto, perfazendo um volume final de 200 µL por poço. Como controlo positivo preencheram-se poços apenas com MH não inoculado e não suplementado e outros com apenas o solvente usado na preparação das soluções *stock* dos compostos testados (2-propanol ou a mistura de etanol:PBS no caso dos compostos etanólicos). Como controlo negativo foi utilizado o meio MH suplementado com cloranfenicol (30 µg/mL). O crescimento foi monitorizado por espectrofotometria por um período de 16 horas com recurso a um leitor de microplacas (Tecan Infinite M200, Tecan, Austria) utilizando o comprimento de onda de 600_{nm}. Neste procedimento as leituras da densidade ótica (DO) não foram sujeitas a calibração antes da leitura pelo leitor de microplacas pelo que foram incluídos poços com meio de cultura e outros com meio de cultura suplementado com o composto a testar (ácido gálgico, ácido ferúlico ou eugenol) nas respetivas concentrações. O valor da média registado na leitura destes poços foi retirado ao valor de absorvência de cada poço com a suspensão bacteriana. A partir dos valores de DO_{600nm} obtidos foram construídas as curvas de crescimento e determinou-se o valor da CMI. As microplacas foram mantidas a 37°C durante 16 horas. As determinações foram realizadas em triplicado.

Após o período de incubação da microplaca foram transferidos 10 μ L de cada uma das suspensões bacterianas presentes nos poços para placas de MHa de forma a confirmar a viabilidade bacteriana e a sua pureza. Estas placas foram incubadas a 37°C durante a noite. O valor CMB foi considerado o correspondente à concentração mínima de composto onde não se recuperou o crescimento bacteriano em placa.

2.5. Avaliação do efeito da utilização dos compostos em modo contínuo, na suscetibilidade de *P. aeruginosa* aos antibióticos

A avaliação do efeito de adaptação, ou seja, o efeito da exposição sucessiva na suscetibilidade das estirpes bacterianas em estudo ao ácido ferúlico e ao eugenol foi realizada como descrito em Hammer et al. (2012) e Apolónio et al. (2014).

As estirpes bacterianas foram cultivadas em meio MHa e a partir destas culturas foram inoculados 10 ml de caldo MH. A incubação decorreu a 37°C durante a noite em banho-maria com agitação (120 rpm). De cada cultura foram transferidos 300 μ L para um tubo *ependorf* que foi depois centrifugado (2790 x g, 5 min a 4°C). O *pellet* obtido foi ressuspenso em 300 μ L de meio MH suplementado com a concentração sub-inibitória de cada composto (inferior ao valor CMI determinado através da análise das curvas de crescimento). Foi utilizada a totalidade da suspensão bacteriana para inocular 10 mL de caldo MH suplementado com a mesma concentração de composto e mediu-se a DO_{600nm} inicial (os valores variaram entre 0,02 – 0,04). A incubação decorreu a 37°C em banho-maria com agitação (120 rpm) durante 24 horas. Durante quatro dias consecutivos registou-se o valor da DO_{600nm} de cada uma das culturas e as células bacterianas foram transferidas para novo meio suplementado com a mesma concentração. Ao fim de quatro passagens seriadas na mesma concentração de composto, as células bacterianas foram transferidas para caldo MH suplementado com uma concentração mais elevada do mesmo composto. Como controlo, de modo paralelo, as células foram cultivadas em caldo MH sem adição do composto. O procedimento foi repetido até à inibição do crescimento bacteriano, ou seja, quando o valor da DO_{600nm} ao fim das 24 horas foi igual ao valor da DO_{600nm} inicial.

Os ensaios foram realizados em triplicado.

2.6. Determinação dos perfis de suscetibilidade aos antibióticos

O efeito da adaptação ao ácido ferúlico e ao eugenol não foi avaliado apenas em relação ao crescimento bacteriano mas também relativamente à suscetibilidade aos antibióticos. Esta avaliação foi feita através do método de difusão em disco ou método Kirby-Bauer. Este método tem sido o mais usado na realização de testes de suscetibilidade antimicrobiana sendo o método de eleição dos laboratórios clínicos (EUCAST 2015).

O método de difusão em disco consiste na utilização de discos de papel de filtro impregnados com uma concentração conhecida do agente antibacteriano a testar. Estes discos são colocados sobre uma placa de agar previamente inoculada com o microrganismo alvo. Após a incubação das placas é possível determinar se a estirpe em questão é Sensível (S), Resistente (R) ou se tem um comportamento Intermédio (I) relativamente ao agente antibacteriano. Este tipo de análise é feita através da medição do halo de inibição (em mm) em torno do disco que traduz ausência de crescimento. Estes valores são posteriormente comparados com os valores universais predefinidos clinicamente (EUCAST 2015).

Após o processo de adaptação descrito na secção anterior procedeu-se à avaliação da suscetibilidade aos antibióticos baseado nos valores de *breakpoint* indicados pelo EUCAST (2015). As células bacterianas foram adaptadas a concentrações sub-inibitórias de ácido ferúlico e de eugenol conforme descrito anteriormente. Entre cada passagem seriada (após 24h de incubação) avaliou-se o perfil de suscetibilidade aos antibióticos através do teste de difusão em disco numa placa de MHa, o meio *standard* usado nesta técnica (EUCAST 2015). Ao fim de cada passagem retirou-se 500 µL de inóculo (controlo e adaptadas) e centrifugou-se a 2790 x g durante 5 minutos a 4°C. Descartou-se o sobrenadante e ressuspendeu-se as células bacterianas em 500 µL de PBS estéril de modo a obter uma suspensão bacteriana com uma turvação correspondente à escala 0,5 de MacFarland (equivalente a 10⁸ UFC/ml). Utilizou-se 100 µL de cada uma das suspensões para inocular placas de MHa. O inóculo foi preparado de forma homogénea por espalhamento com o auxílio de uma ansa estéril. Após a inoculação da suspensão deixou-se a superfície do meio secar até colocar os discos impregnados com os antibióticos a testar. Os discos foram colocados com o auxílio de uma pinça esterilizada garantindo sempre o contacto total do disco com a superfície de agar. Para a determinação do perfil de suscetibilidade das três estirpes em estudo, quando adaptadas ao ácido ferúlico, utilizaram-se os seguintes antibióticos: Ceftazidima, Ciprofloxacina, Imipenem,

Eritromicina, Vancomicina e Cloranfenicol (Oxoid). Para a determinação do perfil de suscetibilidade das três estirpes em estudo, quando adaptadas ao eugenol, utilizaram-se os seguintes antibióticos: Gentamicina (Sigma), Ceftazidima e Ciprofloxacina (Oxoid). As concentrações utilizadas para cada antibiótico são referidas na Tabela 2.6-1. Como controlo foram utilizadas as células bacterianas não adaptadas, ou seja, células que foram inoculadas apenas em meio MH fresco e transferidas para meio MH não suplementado durante quatro dias consecutivos. As placas foram invertidas e colocadas a incubar durante a noite a 37°C. Foram realizadas três réplicas independentes para cada estirpe.

Após a incubação verificou-se a existência de halos de inibição e a sua uniformidade. Confirmados estes parâmetros mediu-se o diâmetro dos halos de inibição.

Tabela 2.6-4 - Critérios de interpretação dos halos de inibição e respetivas CMI para os antibióticos testados (CLSI, 2007).

Antibiótico	Concentração de fármaco por disco	Diâmetro do halo de inibição (mm)			CMI equivalente (mg/ml)		
		R>	I	S≤	R>	I	S≤
Ceftriaxona	10 µg/mL	-	-	-	-	-	-
Ceftazidima	10 µg/mL	16	-	16	8	-	8
Ciprofloxacina	5 µg/mL	22	-	25	1	-	0,5
Imipenem	10 µg/mL	17	-	20	8	-	4
Eritromicina	15 µg/mL	-	-	-	-	-	-
Vancomicina	30 µg/mL	-	-	-	-	-	-
Cloranfenicol	30 µg/ml	-	-	-	-	-	-
Gentamicina	10 µg/ml	15	-	15	4	-	4

2.7. Avaliação do efeito da utilização do eugenol no sistema de perceção de quórum de *Chromobacterium violaceum*.

A avaliação do efeito do eugenol no sistema de PQ foi realizada com recurso ao modelo bacteriano *Chromobacterium violaceum* CV026 tal como descrito anteriormente (Norizan et al. 2013; Mcclean et al. 1997). A estirpe de *C. violaceum* CV026 tem sido frequentemente utilizada como indicadora do funcionamento do sistema de PQ, uma vez que produz um pigmento violáceo na presença de autoindutor exógeno (homoserina

lactona (*N*-hexanoil-L-homoserina lactona, [C6-HSL]), sendo esta estirpe denominada como biosensor (McClellan et al. 1997).

Numa primeira fase foi necessário verificar se as concentrações de eugenol a testar não afetavam o crescimento de *C. violaceum* CV026. Para isso, recorreu-se ao método das microdiluições tal como descrito na secção 2.4. Por outro lado foi também essencial verificar se estas mesmas concentrações de eugenol tinham algum efeito sobre o sistema de PQ da espécie modelo. Para isso a estirpe foi cultivada em meio LBa a 30°C durante 24 h. A partir desta cultura utilizou-se uma ansada para inocular 10 mL de caldo LB para obtenção do pré-inóculo. A incubação decorreu durante a noite a 30°C. Preparou-se previamente 40 mL de meio LBa que foi mantido a 45°-50°C de forma a preservar o seu estado liquefeito. O meio LBa foi suplementado com o autoindutor C6-HSL (0,12 µg/mL) no momento antes da sua inoculação. Esta mistura foi inoculada com 8 mL do pré-inóculo de *C. violaceum* (com um valor de DO_{600nm} de 1,2). A mistura foi transferida para placas de Petri de 15 cm e deixou-se solidificar durante 2h. Após este intervalo perfurou-se o agar com o auxílio de uma pipeta de Pasteur de forma a realizar pequenos poços circulares. Preencheu-se cada poço com 40 µL de eugenol nas seguintes concentrações: 492,6; 656,8; 821e 985,2 µg/mL. Como controlo preencheram-se poços com propanol, DMSO, PBS e catequina nas mesmas concentrações de eugenol. A catequina é um conhecido composto, de origem não bacteriana, com atividade anti PQ em *P. aeruginosa* atuando como análoga das moléculas sinal (AHLs) e inibindo a proteína recetora de AHL (Norizan, Yin, e Chan 2013; Vandeputte et al. 2010). As placas de Petri foram colocadas a incubar durante a noite a 30 °C. Foram realizadas três réplicas independentes por estirpe.

Com este procedimento pretendeu-se verificar se o eugenol, quando utilizado nas concentrações acima referidas, tinha efeito inibitório sobre o sistema de PQ em *C. violaceum*. Considerou-se a inexistência de inibição quando toda a superfície do agar apresentava uma cor violácea, sinónimo da viabilidade da PQ, e não ocorriam halos incolores em torno dos poços. Este procedimento funcionou como controlo para os procedimentos seguintes descritos na secção 2.7, pois foi essencial assegurar quais as concentrações de eugenol que afetavam o sistema de PQ de *C. violaceum* sem afetar o seu crescimento.

Após a verificação das concentrações de eugenol a testar, foi ainda necessário realizar um outro procedimento controlo para analisar a possibilidade de o eugenol degradar o autoindutor (C6-HSL). Para isso foram utilizados tubos *ependorf* de 2 mL

contendo 1 mL de meio LB a pH 6,2, suplementado com C6-HSL (0,12 µg/mL) e eugenol nas mesmas concentrações testadas anteriormente. Os tubos *ependorf* foram colocados a incubar durante 16 a 18 horas a 30 °C com agitação (120 rpm). Após o período de incubação extraiu-se o autoindutor C6-HSL através da adição de 1 mL de acetato de etilo. Os tubos *ependorf* foram homogeneizados vigorosamente e deixados a repousar durante 2 minutos onde ocorreu a separação de duas fases. Retirou-se a fase orgânica cuidadosamente para um novo tubo *ependorf* e deixou-se evaporar. Quando a totalidade da fase orgânica evaporou o conteúdo do tubo foi reidratado com 100 µL de PBS.

Previamente foram preparados 40 mL de meio LBA que foi mantido a 45°- 50 °C de forma a preservar o seu estado liquefeito. O meio LBA foi inoculado com 8 mL de cultura de *C. violaceum* e distribuiu-se por placas de Petri que foram deixadas a solidificar durante 2 h. Ao fim desse período foram feitos poços no agar de acordo com o descrito anteriormente. Foram dispensados 10 µL do conteúdo de cada tubo *ependorf* nos poços respetivos. Como controlo preencheu-se poços com propanol, DMSO, PBS e catequina nas mesmas concentrações de eugenol. As placas foram depois colocadas a incubar durante a noite a 30 °C. Foram realizadas três réplicas independentes por estirpe. Considerou-se a existência de degradação do autoindutor sempre que se verificou a inexistência de um halo de cor violácea em torno do poço. Uma redução na produção do pigmento violáceo é indicativa da degradação de C₆-HSL pelo eugenol.

Após realizados os procedimentos controlo e assegurado que o eugenol nas concentrações testadas não inibia o crescimento de *C. violaceum* e nem degradava o autoindutor foi possível prosseguir para o ensaio principal. Pretendeu-se então verificar se o eugenol inibia a síntese de AHLs (do inglês *N*-acyl-Homoserine Lactone) nas três estirpes de *P. aeruginosa* em estudo. Uma inibição da sua síntese é indicadora da existência de atividade anti PQ do eugenol sobre a bactéria em estudo. O procedimento descrito em seguida baseou-se no descrito por Norizan et al. (2013).

As suspensões das três estirpes de *P. aeruginosa* em estudo foram preparadas em tubos *Falcon* com 10 ml de meio LB suplementado com eugenol a 131,36; 164,2 e 328,4 µ/mL. Em paralelo incubaram-se as mesmas três estirpes de *P. aeruginosa* em 10 mL de meio LB sem adição de eugenol e mediu-se a DO_{600nm} inicial e final. As suspensões bacterianas foram incubadas a 30°C durante a noite. Após o período de incubação procedeu-se à extração das AHLs pelo mesmo processo descrito anteriormente com recurso ao acetato de etilo. Previamente preparou-se 40 mL de meio LBA que foi mantido

a 45°-50 °C de forma a preservar o seu estado liquefeito. Inoculou-se o meio LBa com 8 mL de cultura de *C. violaceum* e distribuiu-se por placas de Petri que foram deixadas a solidificar durante 2h. Ao fim desse período realizou-se poços no agar de acordo com o descrito anteriormente. Após a extração, evaporação e reidratação do conteúdo dos *Falcons* incubados, dispensou-se 10 µL de cada um dos tubos nos respetivos poços em LBa. Como controlo, preencheram-se poços com propanol, DMSO, PBS e catequina nas mesmas concentrações de eugenol. As placas de Petri foram colocadas a incubar durante a noite a 30 °C. Foram realizadas três réplicas independentes por estirpe.

2.8. Avaliação do potencial de virulência de *P. aeruginosa* após exposição em contínuo ao eugenol utilizando o modelo *Galleria mellonella*.

O efeito da adaptação ao eugenol no potencial de virulência das três estirpes de *P. aeruginosa* em estudo foi avaliado através da utilização do modelo *Galleria mellonella* (larva da cera). As larvas utilizadas neste estudo foram fornecidas pelo Professor Doutor Luís Neto, do Centro de Estudos de Ciências e Tecnologias Agrárias, da Universidade do Algarve. Estas foram criadas com pólen e cera e com uma dieta à base de glicerol, mel, água, ração para cães e farelo de trigo sendo mantidas à temperatura ambiente e na ausência de luz até à sua utilização.

Para a adaptação das estirpes bacterianas ao eugenol procedeu-se de acordo como descrito na secção 2.5, durante três dias consecutivos. As células foram adaptadas a uma concentração sub-inibitória de eugenol (131,36 µg/mL foi a concentração comum mais elevada nas três estirpes que não afetou o crescimento bacteriano durante o ensaio da adaptação). Como controlo foram utilizadas células não adaptadas, ou seja, crescidas em meio MH fresco sem adição de eugenol. Foram realizadas três réplicas independentes para cada estirpe.

O procedimento descrito de seguida foi baseado no descrito por Apolónio et al. 2014. Ao fim da terceira passagem, cada uma das culturas foi diluída em meio MH fresco até atingir uma DO_{600nm} de 0,5 (equivalente a 10⁸ UFC/mL). Recolheu-se 1 mL da cultura e centrifugou-se a 2790 x g durante 5 minutos a 4°C. Eliminou-se o sobrenadante e ressuspendeu-se as células em 1 mL de PBS. Foram infetadas 10 larvas com 10 µL da suspensão bacteriana inicial (10⁶ UFC) por injeção na segunda pro-pata direita do segundo conjunto de pro-patas, utilizando uma micro seringa de 50 µL (SGE Analytical

Science, Austrália). Como controlo injetou-se o mesmo número de larvas apenas com PBS (10 µL). Antes de injetar as larvas, a superfície destas foi desinfetada com álcool a 70%. Após a injeção as larvas foram colocadas em placas de Petri estéreis a incubar a 37°C. A sobrevivência das larvas foi monitorizada a cada 24 h durante 5 dias examinando individualmente cada larva. Foi avaliada a sua resposta ao toque e a produção de pigmentação (melanização). Considerou-se uma larva como morta quando esta não reagia ao toque.

Em paralelo determinou-se a viabilidade bacteriana pelo método de Miles e Misra (1938). Foram realizadas três réplicas independentes por estirpe.

3. Resultados e Discussão

3.1. Suscetibilidade de *P. aeruginosa* ao ácido ferúlico, ácido gálico e ao eugenol

No presente estudo foi determinada a atividade antibacteriana de dois componentes do extrato de medronho, nomeadamente o ácido gálico e o ácido ferúlico e ainda o eugenol, um componente do óleo essencial do cravo-da-índia contra três estirpes de *P. aeruginosa*.

A suscetibilidade das três estirpes de *P. aeruginosa* ao ácido gálico encontra-se ilustrada nas Figuras 3.1.1 – 3.1.3.

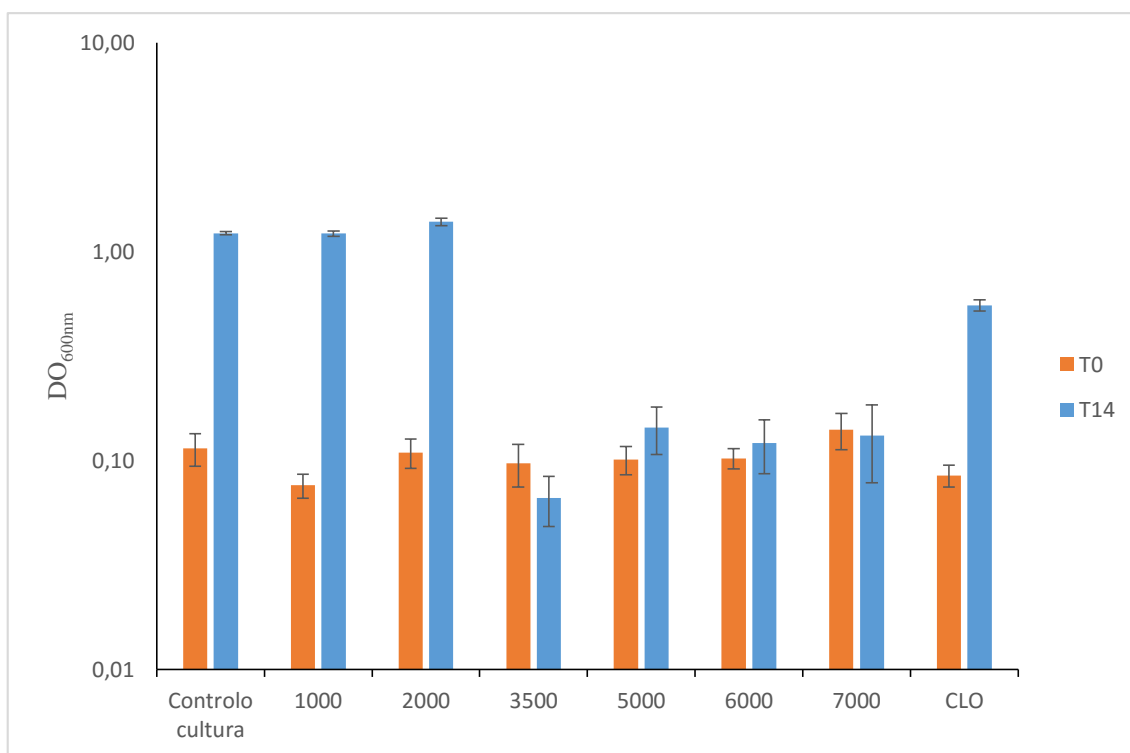


Figura 3.1.1- Crescimento de *P. aeruginosa* DSM 939 na ausência (controlo) e na presença de diferentes concentrações ($\mu\text{g/mL}$) de ácido gálico e do antibiótico cloranfenicol (CLO) ($30 \mu\text{g/mL}$). Os dados são representativos de três ensaios independentes ($N=6$). As barras de erro representam o desvio padrão.

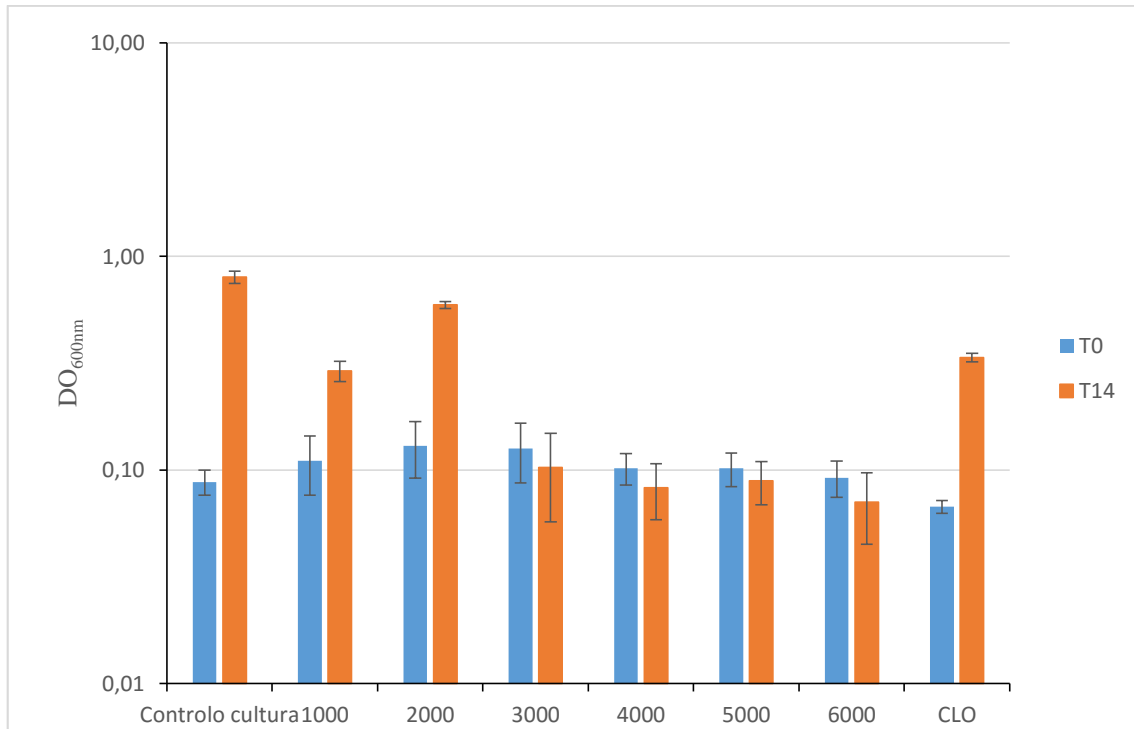


Figura 3.1.2 - Crescimento de *P. aeruginosa* ATCC 27853 na ausência (controlo) e na presença de diferentes concentrações ($\mu\text{g/mL}$) de ácido gálico, do antibiótico cloranfenicol (CLO) ($30 \mu\text{g/mL}$). Os dados são representativos de três ensaios independentes ($N=6$). As barras de erro representam o desvio padrão.

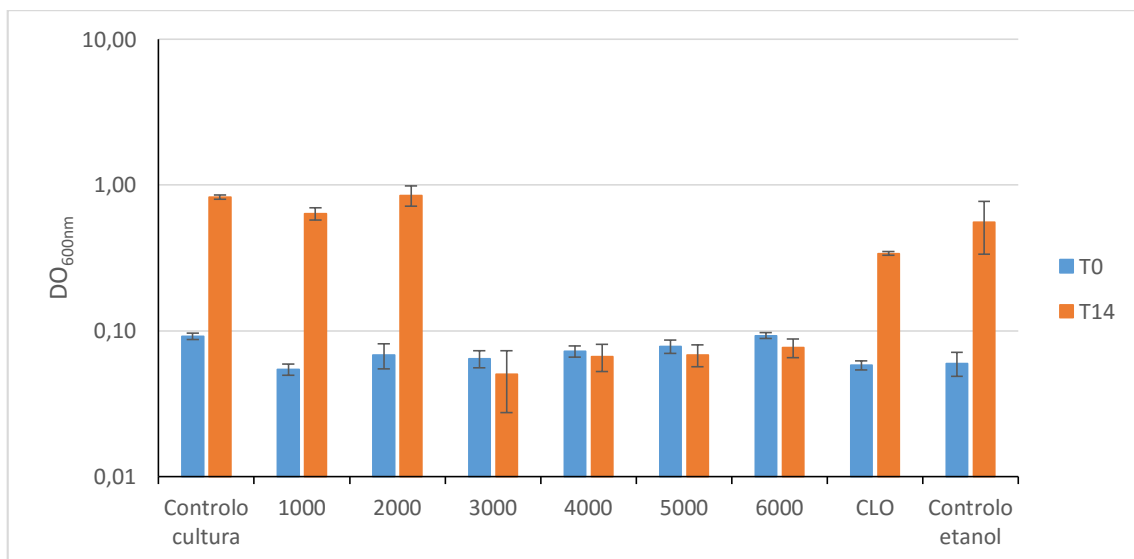


Figura 3.1.3 - Crescimento de *P. aeruginosa* UAlg 114 na ausência (controlo) e na presença de diferentes concentrações ($\mu\text{g/mL}$) de ácido gálico, do antibiótico cloranfenicol (CLO) ($30 \mu\text{g/mL}$). Os dados são representativos de três ensaios independentes ($N=6$). As barras de erro representam o desvio padrão.

O crescimento das três estirpes de *P. aeruginosa* foi inibido a concentrações superiores a $2000 \mu\text{g/mL}$ de ácido gálico.

Após o crescimento na presença do ácido gálgico a recuperação da viabilidade em meio de cultura sólido sem adição de qualquer agente antibacteriano foi analisada. A recuperação da viabilidade das estirpes ATCC 27853 e UAlg 114 foi nula a partir de 4000 µg/mL, enquanto que para a estirpe DSM 939 foi a partir de 5000 µg/mL. Deste modo, em conformidade com os resultados obtidos pelo método de microdiluição, os valores de CMI variaram entre 3000 µg/mL, para as estirpes ATCC 27853 e UAlg 114, e 3500 µg/mL de ácido gálgico para a estirpe DSM 939. Quanto aos valores da concentração mínima bactericida (CMB) para o ácido gálgico foi de 4000 µg/mL para as estirpes ATCC 27853 e UAlg 114 e de 5000 µg/mL para a estirpe DSM 939. No estudo de Borges et al. (2012) e Borges et al. (2013), os valores CMI e CMB do ácido gálgico para a estirpe *P. aeruginosa* ATCC 10145 foram de 500 µg/mL em ambos. Estes valores são bastante inferiores ao que se obteve no presente estudo o que leva a crer que as três estirpes utilizadas são consideravelmente mais resistentes ao ácido gálgico do que a estirpe utilizada no estudo de Borges et al. (2012) e Borges et al. (2013). Por outro lado, embora sejam igualmente inferiores, Jayaraman et al. (2010) obtiveram valores CMI mais próximos dos obtidos neste trabalho. Para as cinco estirpes de *P. aeruginosa* utilizadas por estes autores, ATCC 15692, PA01, PT 121 e dois isolados clínicos: DB5218 e DR3062, o valor de CMI do ácido gálgico foi de 2000 µg/mL. A discrepância entre os métodos utilizados na determinação de atividade antibacteriana assim como o uso de diferentes microrganismos e de estirpes podem ser uma provável explicação aos diferentes valores de CMI obtidos em diferentes estudos. É, pois, conveniente a utilização de diferentes estirpes na determinação do potencial de ação de compostos antibacterianos (Faleiro 2011; Fisher et al. 2007).

A ação do ácido ferúlico sobre o crescimento das três estirpes de *P. aeruginosa* está ilustrada nas Figuras 3.1.4 - 3.1.6.

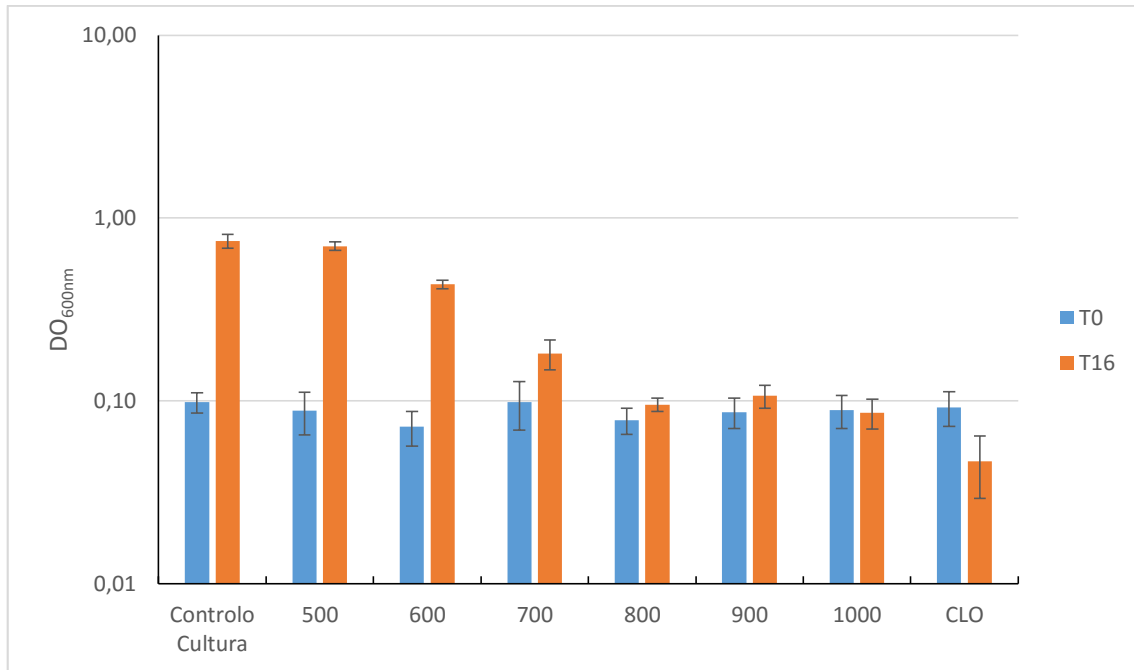


Figura 3.1.4- Crescimento de *P. aeruginosa* DSM 939 na ausência (controlo) e na presença de diferentes concentrações ($\mu\text{g/mL}$) de ácido ferúlico, do antibiótico cloranfenicol (CLO) ($30 \mu\text{g/mL}$). Os dados são representativos de três ensaios independentes ($N=6$). As barras de erro representam o desvio padrão.

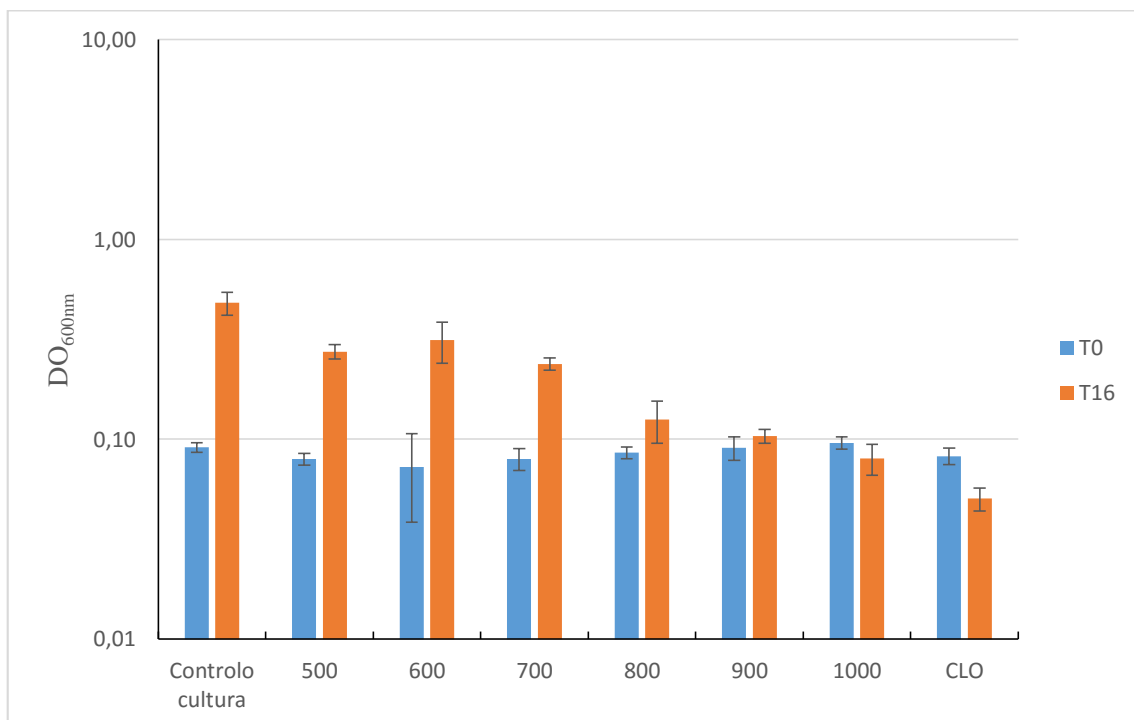


Figura 3.1.5- Crescimento de *P. aeruginosa* ATCC 27853 na ausência (controlo) e na presença de diferentes concentrações ($\mu\text{g/mL}$) de ácido ferúlico, do antibiótico cloranfenicol (CLO) ($30 \mu\text{g/mL}$). Os dados são representativos de três ensaios independentes ($N=6$). As barras de erro representam o desvio padrão.

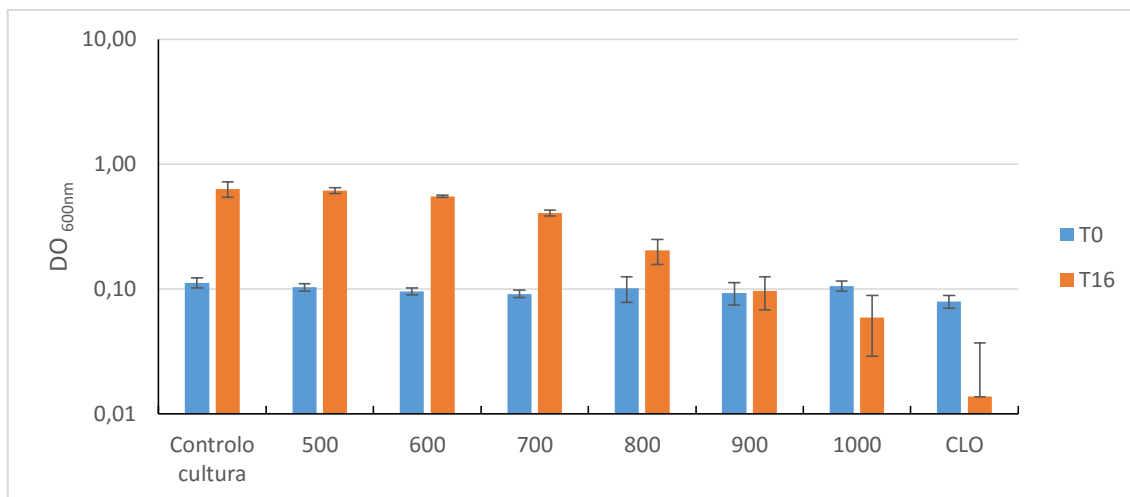


Figura 3.1.6 - Crescimento de *P. aeruginosa* UAlg 114 na ausência (controlo) e na presença de diferentes concentrações ($\mu\text{g/mL}$) de ácido ferúlico, do antibiótico cloranfenicol (CLO) (30 $\mu\text{g/mL}$). Os dados são representativos de três ensaios independentes ($N=6$). As barras de erro representam o desvio padrão.

Considerando os resultados ilustrados nas Figuras 3.1.4 – 3.1.6, pode verificar-se que a estirpe DSM 939 não apresentou crescimento quando na presença de concentrações de ácido ferúlico superiores a 700 $\mu\text{g/mL}$. As estirpes ATCC 27853 e UAlg 114 toleraram concentrações de ácido ferúlico ligeiramente superiores, não havendo crescimento em concentrações acima de 800 $\mu\text{g/mL}$. Quando na presença de 800 $\mu\text{g/mL}$ de ácido ferúlico, a estirpe DSM 939 teve o seu crescimento consideravelmente afetado. Ao fim das 16 h de incubação, a cultura exposta a 800 $\mu\text{g/mL}$ de ácido ferúlico apresentou uma $\text{DO}_{600\text{nm}}$ final semelhante à sua $\text{DO}_{600\text{nm}}$ inicial. Verificou-se o mesmo tipo de resultado nas estirpes ATCC 27853 e UAlg 114 quando expostas a 900 $\mu\text{g/mL}$ de ácido ferúlico. Após o crescimento na presença do ácido ferúlico a recuperação da viabilidade celular em meio de cultura sólido sem a presença de qualquer agente antibacteriano foi examinada. A viabilidade das três estirpes em estudo foi recuperada até 1000 $\mu\text{g/mL}$ de ácido ferúlico e foi nula a partir de 2000 $\mu\text{g/mL}$.

De acordo com os resultados obtidos pelo método de microdiluição, os valores de CMI foram de 800 $\mu\text{g/mL}$ de ácido ferúlico para as estirpes DSM 939 e ATCC 27853 e para a estirpe UAlg 114 foi de 900 $\mu\text{g/mL}$. Quanto aos valores CMB, para o ácido ferúlico foi de 2000 $\mu\text{g/mL}$ para as três estirpes de *P. aeruginosa*.

Mais uma vez estes resultados não vão ao encontro dos resultados obtidos por Borges et al. (2013) em que o valor CMI foi de 100 $\mu\text{g/mL}$ e o valor CMB foi de 500 $\mu\text{g/mL}$ (Borges et al. 2012) de ácido ferúlico para a estirpe *P. aeruginosa* ATCC 10145.

Estes valores são muito inferiores aos obtidos no presente estudo o que leva a crer, à semelhança do que se verificou para o ácido gálgico, que as três estirpes utilizadas são consideravelmente mais resistentes ao ácido ferúlico do que a estirpe utilizada por Borges et al. (2012) e Borges et al. (2013). Contrariamente aos resultados obtidos por Borges et al. (2013), em que obteve o mesmo valor de CMB dos ácidos gálgico e ferúlico para a estirpe de *P. aeruginosa* ATCC 10145, no presente estudo os ácidos fenólicos apresentaram diferentes valores de CMB para as estirpes estudadas. Conforme já referido acima, estes resultados evidenciam as limitações de apenas se utilizar uma estirpe neste tipo de ensaios. Contudo, também no trabalho de Borges et al. (2013) verificaram uma maior eficácia do ácido ferúlico em relação ao ácido gálgico, ou seja, o ácido ferúlico inibiu o crescimento bacteriano a concentrações mais baixas comparativamente ao ácido gálgico. Este resultado foi também verificado no presente estudo através da obtenção de valores CMI mais baixos para o ácido ferúlico do que para o ácido gálgico.

3.2. Suscetibilidade ao eugenol

A atividade antibacteriana do eugenol foi avaliada através da análise do crescimento bacteriano através do método de microdiluição. O crescimento bacteriano obtido na presença de diferentes concentrações de eugenol encontra-se ilustrado nas Figuras 3.2.1-3.2.3.

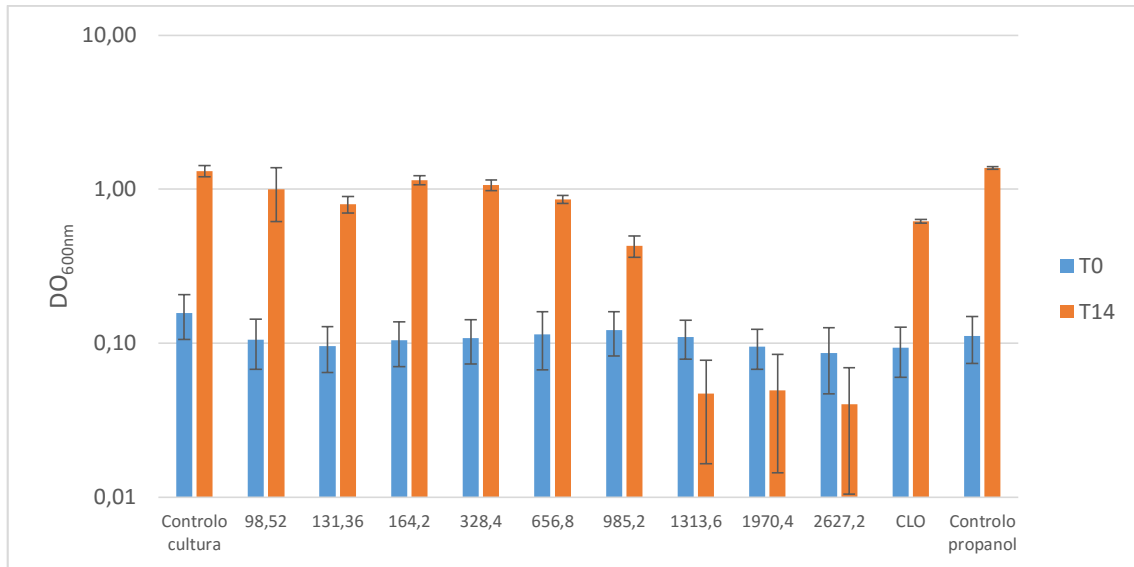


Figura 3.2.1- Crescimento de *P. aeruginosa* DSM 939 na ausência (controlo) e na presença de diferentes concentrações ($\mu\text{g/mL}$) de eugenol. O antibiótico cloranfenicol (CLO) ($30\mu\text{g/mL}$) e o propanol foram também utilizados como controlo. Os dados são representativos de três ensaios independentes ($N=6$). As barras de erro representam o desvio padrão.

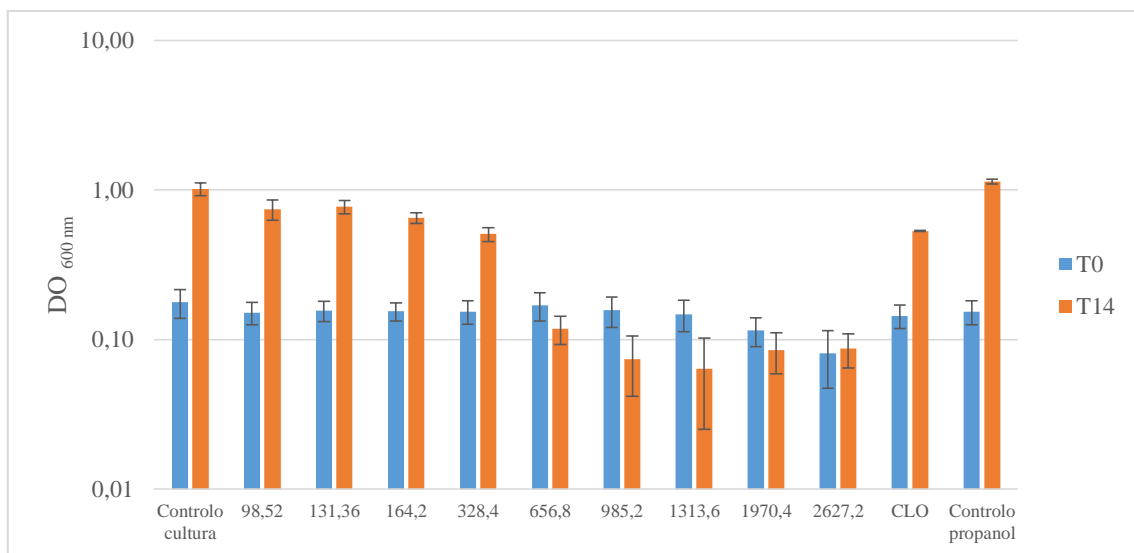


Figura 3.2.2 - Crescimento de *P. aeruginosa* ATCC 27853 na ausência (controlo) e na presença de diferentes concentrações ($\mu\text{g/mL}$) de eugenol. O antibiótico cloranfenicol (CLO) ($30\mu\text{g/mL}$) e o propanol foram também utilizados como controlo. Os dados são representativos de três ensaios independentes ($N=6$). As barras de erro representam o desvio padrão.

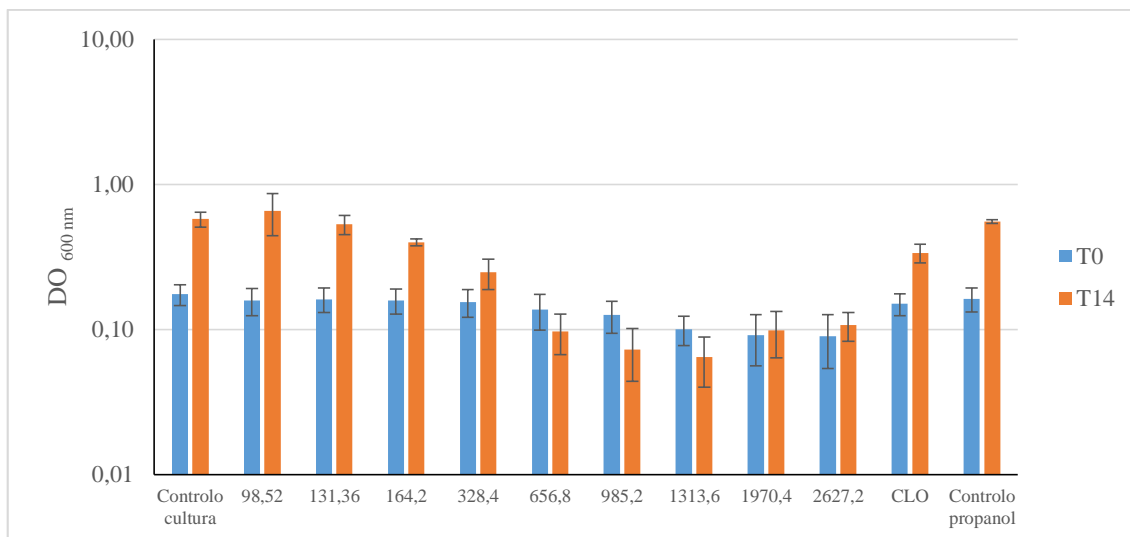


Figura 3.2.3- Crescimento de *P. aeruginosa* UAlg 114 na ausência (controlo) e na presença de diferentes concentrações ($\mu\text{g/mL}$) de eugenol. O antibiótico cloranfenicol (CLO) ($30\mu\text{g/mL}$) e o propanol foram também utilizados como controlo. Os dados são representativos de três ensaios independentes ($N=6$). As barras de erro representam o desvio padrão.

As três estirpes de *P. aeruginosa* demonstraram diferentes suscetibilidades ao eugenol, em particular o crescimento da estirpe DSM 939 foi ligeiramente inibido à concentração de $985,2 \mu\text{g/mL}$, enquanto que o crescimento das estirpes ATCC 27853 e UAlg 114 foi fortemente inibido a esta mesma concentração.

A recuperação de viabilidade das três estirpes de *P. aeruginosa* foi observada até à concentração de $1313,6 \mu\text{g/mL}$ de eugenol e foi nula a $1970,4 \mu\text{g/mL}$. De acordo com os resultados obtidos, o valor de CMI para as estirpes ATCC 27853 e UAlg 114 foi de $656,8 \mu\text{g/mL}$ e para a estirpe DSM 939 foi de $1313,6 \mu\text{g/mL}$. O valor CMB foi de $1970,4 \mu\text{g/mL}$ para qualquer uma das três estirpes.

3.3. Avaliação da resposta de adaptação ao ácido ferúlico e ao eugenol

Comprovada a atividade antimicrobiana dos compostos em estudo contra as três estirpes de *P. aeruginosa* pretendeu-se avaliar a possibilidade de ocorrência de desenvolvimento de tolerância ao ácido ferúlico e ao eugenol. O ácido ferúlico mostrou ser mais eficaz a concentrações mais baixas em comparação com o ácido gálgico contra as três estirpes de *P. aeruginosa* em estudo apresentando valores de CMI e CMB inferiores. Por esta razão o ácido ferúlico foi selecionado para avaliar o efeito da exposição sequencial (continuada) na aquisição de tolerância ao próprio componente e na aquisição de resistência aos antibióticos. O composto eugenol foi igualmente selecionado

para este tipo de ensaio uma vez que tem sido reportada a sua ação contra *P. aeruginosa*, mas o número de estirpes utilizadas nos estudos é muito limitado (apenas a estirpe *P. aeruginosa* PAO1) e o impacto da exposição continuada desta bactéria com um perfil de resistência tão marcante é ainda desconhecido (Husain et al., 2013; Zhou et al. 2013). O ensaio de adaptação ao eugenol e ao ácido ferúlico foi iniciado a uma concentração de 98,52 µg/mL e de 500 µg/mL, respetivamente (Tabela 3.3-1). Os resultados do crescimento na presença das concentrações sub-inibitórias e inibitórias dos compostos são apresentados na Tabela 3.3-1. O crescimento da estirpe DSM 939 foi inibido à concentração de 656,8 µg/mL de eugenol após a primeira passagem. O crescimento da estirpe ATCC 27853 também foi inibido à concentração de 656,8 µg/mL de eugenol, mas após a segunda passagem. Relativamente à estirpe UAlg 114, esta revelou ser muito mais suscetível, pois após a exposição continuada ao eugenol o seu crescimento foi inibido após a primeira passagem na concentração de 164,2 µg/mL, uma concentração muito inferior comparativamente às outras duas estirpes. Deste modo, o crescimento de qualquer uma das estirpes foi inibido a concentrações inferiores aos valores CMI determinados na secção anterior (3.2). Estes resultados evidenciam a ausência de aquisição de tolerância/resistência ao eugenol pelas três estirpes de *P. aeruginosa* testadas. Relativamente aos resultados da adaptação ao ácido ferúlico (Tabela 3.3-1), o crescimento das três estirpes de *P. aeruginosa* foi inibido após a 1ª passagem na concentração de 800 µg/mL tendo atingido valores de DO_{600nm} semelhantes. Tal como foi observado para o eugenol, também para o ácido ferúlico as estirpes de *P. aeruginosa* não conseguiram após as passagens sequenciais crescer na presença de concentrações de ácido ferúlico acima dos valores de CMI. Assim as estirpes estudadas mostraram que não adquirem tolerância/resistência ao eugenol ou ao ácido ferúlico.

Como referido anteriormente, a aquisição de resistência a um agente antimicrobiano, tal como um antibiótico, pode derivar entre outros fatores a uma exposição continuada da bactéria ao agente. Os resultados obtidos com o eugenol estão de acordo com os obtidos por Apolónio et al. (2014) em que a exposição sequencial de *S. aureus*, MRSA e *L. monocytogenes* ao eugenol não induziu a aquisição de tolerância/resistência a este composto. Ali et al. (2005) também obteve o mesmo tipo de resultados expondo a bactéria *Helicobacter pylori*, uma bactéria Gram negativa, a concentrações sub-inibitórias de eugenol e de cinamaldeído. Após dez passagens sucessivas, os autores verificaram que *H. pylori* não desenvolvia resistência aos compostos testados.

Tabela 3.3-5- Valores do aumento da densidade celular* na presença das concentrações sequenciais do eugenol e ácido ferúlico.

Bactéria/ Passagem	Eugenol					Ácido ferúlico		
	98,52 µg/mL	131,36 µg/mL	164,2 µg/mL	328,4 µg/mL	656,8 µg/mL	500 µg/mL	700 µg/mL	800 µg/mL
<i>P. aeruginosa</i> DSM 939								
1°	43,28 ± 4,02	55,44 ± 8,04	63,73 ± 12,19	22,76 ± 3,96	0,49 ± 0,14	9,50 ± 0,50	14,94 ± 2,41	1,29 ± 0,13
2°	48,52 ± 2,35	55,68 ± 4,74	47,73 ± 8,80	18,21 ± 3,30		22,82 ± 3,39	8,02 ± 0,74	
3°	63,05 ± 14,99	56,72 ± 2,37	97,48 ± 42,84	36,11 ± 17,98	SC	40,31 ± 4,61	6,34 ± 0,47	SC
4°	55,62 ± 9,12	60,32 ± 4,73	42,19 ± 9,57	26,50 ± 13,56		21,39 ± 6,94	7,25 ± 0,91	
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853								
1°	76,25 ± 26,69	34,86 ± 9,33	47,05 ± 18,13	33,89 ± 9,13	30,87 ± 12,90	17,95 ± 2,56	26,04 ± 3,48	1,16 ± 0,06
2°	30,78 ± 2,94	39,58 ± 9,94	55,39 ± 14,31	16,54 ± 4,43	0,84 ± 0,36	24,27 ± 2,60	7,46 ± 0,98	SC
3°	39,18 ± 9,81	50,33 ± 10,49	55,84 ± 17,01	35,97 ± 1,78	SC	47,78 ± 15,37	5,04 ± 0,28	
4°	46,62 ± 1,03	68,38 ± 11,44	64,27 ± 35,12	54,32 ± 27,42		19,30 ± 2,68	12,03 ± 2,45	
<i>P. aeruginosa</i> UAlg 114								
1°	54,36 ± 19,72	34,70 ± 6,07	0,73 ± 0,36			11,29 ± 0,84	21,17 ± 5,92	1,16 ± 0,16
2°	50,86 ± 4,45	28,62 ± 1,83		SC	SC	24,90 ± 3,19	5,28 ± 1,36	
3°	25,30 ± 8,04	42,27 ± 10,19	SC		SC	29,73 ± 4,50	7,65 ± 0,40	SC
4°	49,21 ± 16,72	65,72 ± 16,39				15,53 ± 2,64	8,53 ± 0,26	

* O aumento da densidade celular em cada passagem foi calculado como a razão entre a DO_{600nm} às 24 h (T24) e a DO_{600nm} no tempo zero (T0) (DO_{600nm} T24/DO_{600nm} T0). Os valores expressos representam a média de três réplicas ± desvio padrão. SC- sem crescimento

3.4. Determinação dos perfis de suscetibilidade aos antibióticos após a adaptação ao ácido ferúlico e ao eugenol

De modo a clarificar se durante o processo de adaptação da bactéria *P. aeruginosa* ao ácido ferúlico e ao eugenol ocorria a indução de resistência aos antibióticos, determinou-se a suscetibilidade a diferentes antibióticos. Como referido anteriormente, as células bacterianas foram previamente adaptadas a concentrações sub-inibitórias de ácido ferúlico ou de eugenol durante quatro passagens seriadas. A identificação do perfil de suscetibilidade foi realizada de acordo com os valores de “*breakpoint*” referidos pela EUCAST (2015).

3.4.1. Determinação do perfil de suscetibilidade aos antibióticos após adaptação ao ácido ferúlico

O perfil de suscetibilidade aos antibióticos após adaptação das três estirpes de *P. aeruginosa* ao ácido ferúlico foi realizado ao fim da quarta passagem de cada concentração nas culturas adaptadas e controlo (Tabela 3.4.1-1). As culturas controlo das três estirpes mostraram ter um perfil suscetível a todos os antibióticos utilizados no procedimento (Tabela 3.4.1-1). Verificou-se um ligeiro aumento na suscetibilidade à ceftriaxona nas células das estirpes DSM 939 e ATCC 27853 adaptadas ao ácido ferúlico quando comparadas com as células não adaptadas (controlo). Contudo, quando comparando as células adaptadas a 500 µg/mL e a 700 µg/mL de ácido ferúlico não se verificou aumento de suscetibilidade entre concentrações pelo que as alterações na suscetibilidade não foram dependentes da concentração de ácido ferúlico. Verificou-se ainda que as três estirpes em estudo, apesar do aumento de suscetibilidade à ceftriaxona (no caso das estirpes DSM 939 e ATCC 27853), desenvolveram colónias resistentes ao antibiótico quando adaptadas ao ácido ferúlico (Figura 3.4.1.1).



Figura 3.4.1.1- Colónias de *P. aeruginosa* DSM 939 e de *P. aeruginosa* ATCC 27853 adaptadas ao ácido ferúlico resistentes à ceftriaxona.

Tabela 3.4.1-6 – Determinação do perfil de suscetibilidade aos antibióticos das culturas controle e adaptadas ao ácido ferúlico de *P. aeruginosa*. O diâmetro da zona de inibição inclui o diâmetro do disco (6mm).

Concentração ácido ferúlico	CRO Dh ± Dp (mm)	VA Dh ± Dp (mm)	IPM Dh ± Dp (mm)	CN Dh ± Dp (mm)	E Dh ± Dp (mm)	CIP Dh ± Dp (mm)
DSM 939	Controlo / Adaptadas	Controlo / Adaptadas	Controlo / Adaptadas	Controlo / Adaptadas	Controlo / Adaptadas	Controlo / Adaptadas
500 µg/mL	17,00 ± 1,00	0,00 ± 0,00	24,67 ± 1,11	27,75 ± 0,69	12,33 ± 1,37	25,92 ± 2,62
	21,33 ± 0,94	0,00 ± 0,00	26,83 ± 1,57	30,17 ± 0,90	10,83 ± 1,21	27,58 ± 1,24
700 µg/mL	19,67 ± 0,47	0,00 ± 0,00	25,83 ± 0,85	26,67 ± 0,47	9,00 ± 0,82	25,67 ± 0,94
	20,83 ± 0,69	0,00 ± 0,00	27,00 ± 1,29	30,17 ± 0,69	0,00 ± 0,00	28,17 ± 1,07
ATCC 27853	Controlo / Adaptadas	Controlo / Adaptadas	Controlo / Adaptadas	Controlo / Adaptadas	Controlo / Adaptadas	Controlo / Adaptadas
500 µg/mL	18,40 ± 4,03	7,80 ± 9,56	23,40 ± 3,50	27,40 ± 1,36	8,80 ± 1,17	25,40 ± 0,49
	23,00 ± 0,58	0,00 ± 0,00	23,50 ± 2,99	30,00 ± 0,58	10,00 ± 2,08	27,50 ± 1,50
700 µg/mL	18,40 ± 4,03	7,80 ± 9,56	23,40 ± 3,50	27,40 ± 1,36	8,80 ± 1,17	25,40 ± 0,49
	24,33 ± 1,37	0,00 ± 0,00	24,50 ± 1,98	29,67 ± 1,25	0,00 ± 0,00	27,00 ± 1,00
UAlg 114	Controlo / Adaptadas	Controlo / Adaptadas	Controlo / Adaptadas	Controlo / Adaptadas	Controlo / Adaptadas	Controlo / Adaptadas
500 µg/mL	22,33 ± 2,62	0,00 ± 0,00	32,67 ± 3,09	28,33 ± 1,89	9,33 ± 1,25	27,00 ± 1,63
	21,00 ± 4,16	0,00 ± 0,00	31,50 ± 1,89	30,83 ± 1,95	0,00 ± 0,00	30,17 ± 3,93
700 µg/mL	22,33 ± 2,62	0,00 ± 0,00	32,67 ± 3,09	28,33 ± 1,89	9,33 ± 1,25	27,00 ± 1,63
	23,83 ± 1,21	0,00 ± 0,00	31,17 ± 1,46	29,25 ± 0,43	0,00 ± 0,00	28,67 ± 0,47

Dh – Diâmetro do halo; CRO – ceftriaxona; VA – vancomicina; IPM – imipenem; CN – gentamicina; E – eritromicina; CIP – ciprofloxacina.

Os valores expressos representam a média de três réplicas ± desvio padrão.

As células adaptadas da estirpe DSM 939 tiveram um aumento de suscetibilidade ao imipenem nas duas concentrações de ácido ferúlico testadas enquanto que na estirpe ATCC 27853 esse aumento de suscetibilidade só foi evidente nas células adaptadas a 700 µg/mL de ácido ferúlico. As células adaptadas da estirpe UAlg 114 mantiveram um perfil de suscetibilidade semelhante às células controlo.

A adaptação ao ácido ferúlico promoveu um aumento de suscetibilidade à gentamicina para as três estirpes de *P. aeruginosa* sendo esse aumento menos significativo para a estirpe UAlg 114. Por outro lado, a adaptação conduziu a alterações na suscetibilidade à eritromicina em comparação com as culturas controlo, passando de suscetível para resistente. Esse decréscimo no halo de inibição foi mais evidente nas estirpes DSM 939 e ATCC 27853 adaptadas a 700 µg/mL de ácido ferúlico. Obteve-se o mesmo tipo de resultado para a estirpe UAlg 114 quando adaptada a uma concentração mais baixa de ácido ferúlico (500 µg/mL).

A exposição prolongada ao ácido ferúlico conduziu a um ligeiro aumento de suscetibilidade à ciprofloxacina nas três estirpes estudadas, sendo que a estirpe UAlg reverteu esse efeito quando exposta a uma concentração mais elevada de ácido ferúlico (700 µg/mL) para valores próximos aos registados para as células controlo.

3.4.2. Determinação do perfil de suscetibilidade aos antibióticos após adaptação ao eugenol

De modo a identificar em que passagem é que possa ter ocorrido a aquisição de resistência ou maior suscetibilidade, no ensaio com o componente eugenol optou-se por determinar o perfil de suscetibilidade em todas as passagens seriadas. Por questões alheias ao laboratório foi necessário adaptar o procedimento ao material existente (longo processo burocrático na aquisição do material). Deste modo, os antibióticos utilizados na determinação da suscetibilidade durante o processo de adaptação foram ligeiramente diferentes entre os dois componentes, eugenol e ácido ferúlico.

As células controlo da estirpe DSM 939 revelaram ser mais suscetíveis quer à ciprofloxacina ($29,33 \pm 0,94$ mm) quer à ceftazidima ($\geq 20,67 \pm 1,60$ mm) ou à gentamicina ($\geq 19,33 \pm 0,75$ mm) (Tabela 3.4.2-1).

Tabela 3.4.2-7 - Determinação do perfil de suscetibilidade aos antibióticos das culturas controle e adaptadas de *P. aeruginosa* DSM 939 ao eugenol. O diâmetro da zona de inibição inclui o diâmetro do disco (6mm). Os valores expressos representam a média de três réplicas \pm desvio padrão. Legenda: Dh – diâmetro do halo; Dp – Desvio padrão.

Concentração eugenol	Ciprofloxacina Dh \pm Dp (mm)	Ceftazidima Dh \pm Dp (mm)	Gentamicina Dh \pm Dp (mm)
98,52 μ g/mL	Controlo / Adaptadas	Controlo / Adaptadas	Controlo / Adaptadas
1º	29,33 \pm 0,94 / 30,33 \pm 0,75	20,67 \pm 1,60 / 22,33 \pm 0,47	19,33 \pm 0,75 / 18,33 \pm 0,47
2º	29,33 \pm 0,94 / 30,33 \pm 1,11	20,67 \pm 1,60 / 23,17 \pm 0,90	19,33 \pm 0,75 / 21,17 \pm 1,07
3º	29,33 \pm 0,94 / 31,00 \pm 0,58	20,67 \pm 1,60 / 22,50 \pm 0,76	19,33 \pm 0,75 / 20,67 \pm 0,47
4º	29,33 \pm 0,94 / 30,50 \pm 0,76	20,67 \pm 1,60 / 22,83 \pm 1,21	19,33 \pm 0,75 / 21,00 \pm 0,82
131,36 μ g/mL	Controlo / Adaptadas	Controlo / Adaptadas	Controlo / Adaptadas
1º	29,00 \pm 1,41 / 30,54 \pm 0,69	22,00 \pm 1,15 / 22,71 \pm 0,58	19,83 \pm 0,37 / 20,29 \pm 0,69
2º	29,00 \pm 1,41 / 30,59 \pm 1,11	22,00 \pm 1,15 / 22,80 \pm 1,21	19,83 \pm 0,37 / 20,78 \pm 1,15
3º	29,00 \pm 1,41 / 30,66 \pm 1,29	22,00 \pm 1,15 / 22,71 \pm 1,50	19,83 \pm 0,37 / 20,68 \pm 0,69
4º	29,00 \pm 1,41 / 30,57 \pm 1,89	22,00 \pm 1,15 / 22,76 \pm 1,83	19,83 \pm 0,37 / 20,69 \pm 0,50
164,2 μ g/mL	Controlo / Adaptadas	Controlo / Adaptadas	Controlo / Adaptadas
1º	30,17 \pm 1,46 / 30,33 \pm 0,47	21,83 \pm 0,69 / 22,67 \pm 1,11	21,00 \pm 1,00 / 20,83 \pm 0,69
2º	30,17 \pm 1,46 / 31,33 \pm 0,94	21,83 \pm 0,69 / 24,67 \pm 1,80	21,00 \pm 1,00 / 21,83 \pm 0,37
3º	30,17 \pm 1,46 / 31,67 \pm 2,05	21,83 \pm 0,69 / 22,83 \pm 1,07	21,00 \pm 1,00 / 21,00 \pm 1,15
4º	30,17 \pm 1,46 / 33,50 \pm 2,14	21,83 \pm 0,69 / 24,33 \pm 0,75	21,00 \pm 1,00 / 22,00 \pm 1,91
328,4 μ g/mL	Controlo / Adaptadas	Controlo / Adaptadas	Controlo / Adaptadas
1º	28,50 \pm 0,76 / 39,50 \pm 1,98	21,50 \pm 0,76 / 26,83 \pm 0,90	20,17 \pm 0,37 / 24,50 \pm 1,50
2º	28,50 \pm 0,76 / 33,50 \pm 1,38	21,50 \pm 0,76 / 24,50 \pm 0,50	20,17 \pm 0,37 / 23,83 \pm 0,90
3º	28,50 \pm 0,76 / 33,67 \pm 2,13	21,50 \pm 0,76 / 24,33 \pm 0,94	20,17 \pm 0,37 / 22,83 \pm 1,21
4º	28,50 \pm 0,76 / 35,50 \pm 1,71	21,50 \pm 0,76 / 24,83 \pm 1,34	20,17 \pm 0,37 / 23,67 \pm 1,25
656,8 μ g/mL	Controlo / Adaptadas	Controlo / Adaptadas	Controlo / Adaptadas
1º	28,50 \pm 0,76 / 36,83 \pm 0,69	21,50 \pm 0,76 / 24,00 \pm 1,00	20,17 \pm 0,37 / 23,33 \pm 0,94

De acordo com os critérios EUCAST (2015) esta estirpe tem um perfil S aos três antibióticos testados ($S \geq 25$ mm para a ciprofloxacina, $S \geq 17$ mm para a ceftazidima e $S \geq 15$ mm para a gentamicina) e não desenvolveu resistência (mutações cromossomais) durante o processo de passagem sequencial. Nas células adaptadas desta estirpe, foi possível observar um aumento de suscetibilidade mais evidente aos três antibióticos durante as quatro passagens a 328,4 $\mu\text{g/mL}$ de eugenol (Tabela 3.4.2-1). As células adaptadas a 656,8 $\mu\text{g/mL}$ de eugenol (apenas uma passagem) demonstraram igualmente uma maior suscetibilidade aos três antibióticos (Tabela 3.4.2-1). Tendo em conta estes resultados é possível dizer que a adaptação ao eugenol teve um efeito potenciador da suscetibilidade aos três antibióticos na estirpe de *P. aeruginosa* DSM 939.

A estirpe ATCC 27853 apresentou um perfil de suscetibilidade semelhante à estirpe DSM 939, mas como foi referido anteriormente esta estirpe foi capaz de suportar uma 2ª passagem à concentração de 656,8 $\mu\text{g/mL}$, embora esta capacidade não tenha conduzido a uma maior resistência aos três antibióticos testados (Tabela 3.4.2-2).

Tabela 3.4.2-8- Determinação do perfil de suscetibilidade aos antibióticos das culturas controlo e adaptadas de *P. aeruginosa* ATCC 27853 ao eugenol. O diâmetro da zona de inibição inclui o diâmetro do disco (6 mm). Os valores expressos representam a média de três réplicas \pm desvio padrão. Legenda: Dh – diâmetro do halo; Dp – Desvio padrão.

Concentração eugenol	Ciprofloxacina Dh \pm Dp (mm)	Ceftazidima Dh \pm Dp (mm)	Gentamicina Dh \pm Dp (mm)
98,52 $\mu\text{g/mL}$	Controlo / Adaptadas	Controlo / Adaptadas	Controlo / Adaptadas
1º	28,17 \pm 1,34 / 29,50 \pm 0,76	20,67 \pm 1,25 / 25,50 \pm 0,76	22,83 \pm 0,90 / 22,17 \pm 0,37
2º	28,17 \pm 1,34 / 29,33 \pm 0,75	20,67 \pm 1,25 / 26,00 \pm 1,29	22,83 \pm 0,90 / 22,00 \pm 1,41
3º	28,17 \pm 1,34 / 30,33 \pm 0,75	20,67 \pm 1,25 / 25,83 \pm 1,46	22,83 \pm 0,90 / 22,67 \pm 1,80
4º	28,17 \pm 1,34 / 33,00 \pm 1,41	20,67 \pm 1,25 / 25,50 \pm 0,76	22,83 \pm 0,90 / 22,50 \pm 0,76
131,36 $\mu\text{g/mL}$	Controlo / Adaptadas	Controlo / Adaptadas	Controlo / Adaptadas
1º	30,67 \pm 1,60 / 33,83 \pm 1,07	26,33 \pm 0,75 / 27,33 \pm 0,75	21,50 \pm 0,76 / 23,67 \pm 0,94
2º	30,67 \pm 1,60 / 31,63 \pm 0,94	26,33 \pm 0,75 / 26,17 \pm 1,77	21,50 \pm 0,76 / 22,71 \pm 1,07
3º	30,67 \pm 1,60 / 32,20 \pm 0,96	26,33 \pm 0,75 / 26,21 \pm 1,21	21,50 \pm 0,76 / 22,89 \pm 1,46
4º	30,67 \pm 1,60 / 32,66 \pm 0,47	26,33 \pm 0,75 / 26,30 \pm 1,25	21,50 \pm 0,76 / 22,94 \pm 0,58

164,2 µg/mL	Controlo / Adaptadas	Controlo / Adaptadas	Controlo / Adaptadas
1°	28,00 ± 1,83 /	22,83 ± 0,37 /	17,83 ± 0,69 /
	32,58 ± 1,80	26,50 ± 0,90	23,05 ± 0,69
2°	28,00 ± 1,83 /	22,83 ± 0,37 /	17,83 ± 0,69 /
	32,67 ± 0,47	24,50 ± 0,76	21,83 ± 1,07
3°	28,00 ± 1,83 /	22,83 ± 0,37 /	17,83 ± 0,69 /
	35,50 ± 1,26	25,50 ± 0,50	21,00 ± 1,00
4°	28,00 ± 1,83 /	22,83 ± 0,37 /	17,83 ± 0,69 /
	35,17 ± 0,90	26,00 ± 1,83	21,67 ± 1,25
328,4 µg/mL	Controlo / Adaptadas	Controlo / Adaptadas	Controlo / Adaptadas
1°	29,00 ± 1,00 /	24,00 ± 0,82 /	19,67 ± 0,47 /
	34,83 ± 1,34	26,17 ± 1,21	21,83 ± 1,07
2°	29,00 ± 1,00 /	24,00 ± 0,82 /	19,67 ± 0,47 /
	34,33 ± 1,49	27,67 ± 0,75	23,67 ± 0,94
3°	29,00 ± 1,00 /	24,00 ± 0,82 /	19,67 ± 0,47 /
	34,00 ± 1,00	26,67 ± 1,11	22,67 ± 1,11
4°	29,00 ± 1,00 /	24,00 ± 0,82 /	19,67 ± 0,47 /
	34,67 ± 1,80	25,83 ± 1,86	21,33 ± 1,97
656,8 µg/mL	Controlo / Adaptadas	Controlo / Adaptadas	Controlo / Adaptadas
1°	29,00 ± 1,00 /	24,00 ± 0,82 /	19,67 ± 0,47 /
	29,50 ± 1,50	25,50 ± 0,76	19,33 ± 0,75
2°	29,00 ± 1,00 /	24,00 ± 0,82 /	19,67 ± 0,47 /
	34,67 ± 0,94	28,42 ± 2,17	23,25 ± 1,07

As células adaptadas da estirpe UAlg 114 mostraram um perfil suscetível aos três antibióticos durante as passagens a 98,52 e 131,36 µg/mL de eugenol. Contudo, as células adaptadas a 164,2 µg/mL de eugenol adquiriram um perfil de resistência à ciprofloxacina ($20,75 \pm 4,02$ mm) após a 1ª passagem traduzido por um halo de inibição inferior a 22 mm que é indicativo de aquisição de resistência (EUCAST, 2015). No entanto este fenómeno não se verificou para o antibiótico ceftazidima ou gentamicina.

Tabela 3.4.2-9- Determinação do perfil de suscetibilidade aos antibióticos das culturas controle e adaptadas de *P. aeruginosa* UAlg 114 ao eugenol. O diâmetro da zona de inibição inclui o diâmetro do disco (6 mm). Os valores expressos representam a média de três réplicas \pm desvio padrão. Legenda: Dh – diâmetro do halo; Dp – Desvio padrão.

Concentração eugenol	Ciprofloxacina Dh \pm Dp (mm)	Ceftazidima Dh \pm Dp (mm)	Gentamicina Dh \pm Dp (mm)
98,52 μ g/mL	Controlo / Adaptadas	Controlo / Adaptadas	Controlo / Adaptadas
1 ^o	30,17 \pm 1,21/ 30,00 \pm 0,00	24,83 \pm 1,21/ 26,00 \pm 1,15	17,67 \pm 0,75/ 18,67 \pm 0,75
2 ^o	30,17 \pm 1,21/ 30,17 \pm 1,46	24,83 \pm 1,21/ 23,17 \pm 2,61	17,67 \pm 0,75/ 18,83 \pm 1,34
3 ^o	30,17 \pm 1,21/ 32,33 \pm 1,97	24,83 \pm 1,21/ 26,17 \pm 0,90	17,67 \pm 0,75/ 19,33 \pm 0,94
4 ^o	30,17 \pm 1,21/ 37,33 \pm 2,75	24,83 \pm 1,21/ 27,50 \pm 1,98	17,67 \pm 0,75/ 20,50 \pm 0,76
131,36 μ g/mL	Controlo / Adaptadas	Controlo / Adaptadas	Controlo / Adaptadas
1 ^o	31,83 \pm 1,57/ 33,33 \pm 1,49	25,83 \pm 1,21/ 28,67 \pm 2,05	18,67 \pm 1,11/ 21,00 \pm 0,58
2 ^o	31,83 \pm 1,57/ 35,33 \pm 1,25	25,83 \pm 1,21/ 30,67 \pm 0,47	18,67 \pm 1,11/ 22,17 \pm 1,07
3 ^o	31,83 \pm 1,57/ 35,83 \pm 2,11	25,83 \pm 1,21/ 28,17 \pm 1,34	18,67 \pm 1,11/ 24,50 \pm 2,06
4 ^o	31,83 \pm 1,57/ 31,67 \pm 2,81	25,83 \pm 1,21/ 24,33 \pm 0,75	18,67 \pm 1,11/ 19,00 \pm 1,15
164,2 μ g/mL	Controlo / Adaptadas	Controlo / Adaptadas	Controlo / Adaptadas
1 ^o	31,83 \pm 1,57/ 20,75 \pm 4,02	25,83 \pm 1,21/ 29,25 \pm 1,92	18,67 \pm 1,11/ 21,75 \pm 0,83

O antibiótico ciprofloxacina pertence ao grupo das fluoroquinolonas, ao qual as bactérias Gram negativas são consideravelmente suscetíveis. Este antibiótico é administrado na terapêutica contra várias infeções, em particular cistites não complicadas, infeções do trato urinário, prostatites bacterianas crónicas e sinusites agudas (Castro et al. 2013). O mecanismo de ação deste antibiótico (incluindo outros do mesmo grupo) permite interromper a replicação e a transcrição do DNA através da inibição da DNA girase/topoisomerase II e a DNA topoisomerase IV bloqueando o desenrolamento e a duplicação do DNA (Nam et al. 2013). Muito recentemente, através da abordagem de sequenciação de alto rendimento, foi possível verificar que para a maior parte dos antibióticos, mas muito particularmente durante a exposição de *P. aeruginosa* a fluoroquinolonas em comparação com cefalosporinas ou carbapenemos, há acumulação de mutações com uma assinatura em “frameshift”, consistente com uma propensão a erros

da DNA polimerase cuja atividade é consequência do sistema SOS (Cabot et al. 2016). Os mecanismos de resistência mais encontrados foram as mutações na região determinante da resistência à quinolona (RDRQ [do inglês QRDR]) assim como a sobreexpressão de bombas de efluxo (não só para ciprofloxacina, mas também para o meropenem (do grupo dos carbapenemas) (Cabot et al. 2016). Embora as células da estirpe UAlg 114 adaptadas ao eugenol a 164,2 µg/mL só tenham conseguido sobreviver a uma exposição a este composto a esta concentração, o facto é que adquiriram resistência o que significa que outras estirpes ambientais, tal como esta, podem eventualmente adquirir resistência durante a exposição ao eugenol pelo que seria recomendável aumentar o conjunto de estirpes ambientais em estudo para clarificar esta capacidade.

3.5. Avaliação do impacto da adaptação ao eugenol no sistema de perceção de quórum

3.5.1. Determinação da atividade antibacteriana do eugenol sobre *Chromobacterium violaceum* CV026

Antes de realizar os estudos sobre o efeito do eugenol sobre a perceção de quórum foi necessário determinar se as concentrações de eugenol a ser testadas não afetavam o crescimento da espécie modelo *Chromobacterium violaceum*. Os resultados obtidos encontram-se ilustrados nas imagens seguintes:

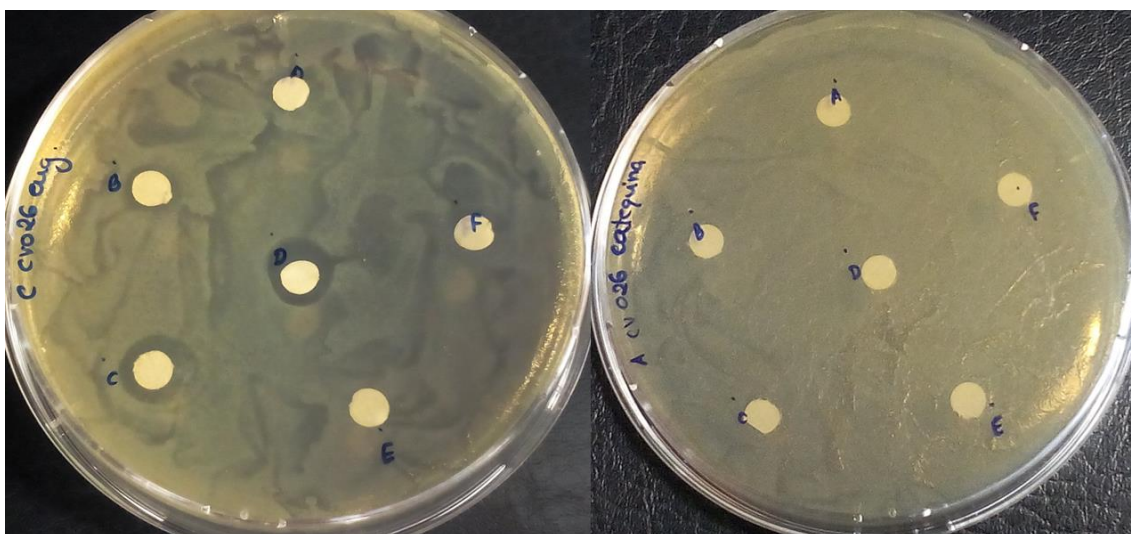


Figura 3.5.1.1- Atividade antibacteriana do eugenol (3.5.1.1.a) e da catequina (3.5.1.1.b)) sobre a bactéria *Chromobacterium violaceum* CV026. Legenda: 3.5.1.a) A – 656,8 µg/mL; B – 985,2 µg/mL; C – 1313,6 µg/mL; D – 1970,4 µg/mL; E – água MilliQ; F – propanol; 3.5.1.b) A – 656,8 µg/mL; B – 985,2 µg/mL; C – 1313,6 µg/mL; D – 1970,4 µg/mL; E – água MilliQ; F – DMSO.

Como se pode verificar na figura 3.5.1.1. o eugenol inibiu o crescimento da bactéria *C. violaceum* CV026 a concentrações superiores a 1313,6 µg/mL (discos C e D). Por outro lado a catequina não mostrou ter qualquer tipo de efeito sobre o crescimento bacteriano de *C. violaceum* pelo que pode ser usada como controlo no ensaio da perceção de quórum dentro da ordem de valores testada. Também os controlos utilizados (água MilliQ, propanol e DMSO) não afetaram o crescimento da bactéria modelo. Tendo em conta os resultados obtidos foi possível prosseguir para os ensaios seguintes.

3.5.2. Avaliação da degradação de C₆-HSL pelo eugenol

Foi realizado um ensaio que teve como principal objetivo verificar se o eugenol degradava o autoindutor (C₆-HSL) sintético a ser utilizada nos procedimentos seguintes. Para isso, o eugenol foi incubado, nas mesmas concentrações testadas anteriormente, com a C₆-HSL sintética a 0,12 µg/µL. Os resultados estão ilustrados na Figura 3.5.2.1.

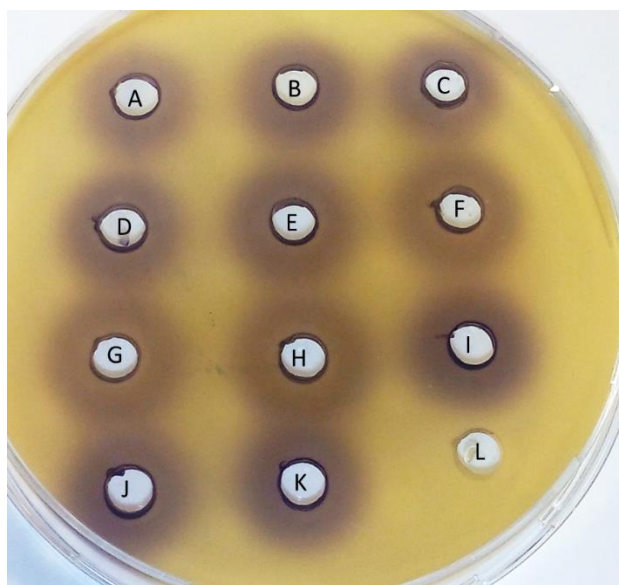


Figura 3.5.2.1 - Degradação de C₆-HSL pelo eugenol. Legenda: A - D eugenol na concentração de 492,6; 656,8; 821 e 985,2 µg/mL, respetivamente; E - H catequina na concentração de 492,6; 656,8; 821 e 985,2 µg/mL, respetivamente; I- DMSO; J – Propanol; K – C₆-HSL sintética a 0,12 µg/µL; L – poço vazio. Neste ensaio a presença de halos violetas em redor dos poços evidencia a presença de C₆-HSL exógena que é reconhecida pelo biossensor que por sua vez produz o pigmento violáceo como resultado do funcionamento do sistema de PQ.

Na Figura 3.5.2.1 é, pois possível verificar que o eugenol não teve qualquer efeito degradativo sobre a C₆-HSL sintética. O mesmo se verificou para a catequina, o propanol e o DMSO que foram usados como controlo. No poço K foi colocada diretamente a C₆-HSL a 0,12 µg/µL sem a presença de eugenol como controlo sobre o funcionamento do

sistema PQ de *C. violaceum* CV026. Tendo em conta estes resultados é possível afirmar que o eugenol não degrada a homosserina sendo assim seguro prosseguir com o ensaio de avaliação do efeito deste composto na síntese de AHL por *P. aeruginosa*. Verificou-se ainda que a homosserina sintética utilizada é reconhecida pela estirpe modelo (poço K) e não é degradada pelos solventes utilizados na preparação dos compostos em estudo (poços I e J).

3.5.3. Avaliação do efeito do eugenol na síntese de AHL por *P. aeruginosa*

No ensaio sobre o efeito do eugenol na síntese de homosserina pelas três estirpes de *P. aeruginosa* em estudo o crescimento foi realizado na presença de eugenol nas concentrações de 131,36; 164,2 e 328,4 $\mu\text{g/mL}$ e na ausência de eugenol. A seleção destas concentrações de eugenol teve como critério serem as concentrações de eugenol mais elevadas comuns às três estirpes de *P. aeruginosa* que não afetaram o seu crescimento (consultar secção 3.2).

Os resultados estão ilustrados na Figura 3.5.3.1. Esta Figura corresponde aos resultados obtidos com a estirpe ATCC 27853, mas o mesmo tipo de resultados foram obtidos para as outras duas estirpes de *P. aeruginosa*.

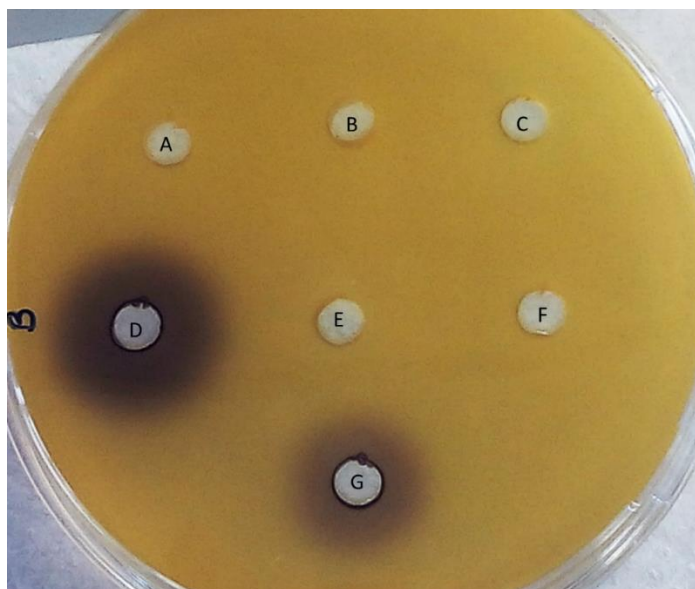


Figura 3.5.3.1- Avaliação do efeito do eugenol sobre a síntese de AHL por *P. aeruginosa*. Legenda: A- C- C₆-HSL extraída após exposição a 131,36; 164,2 e 328,4 $\mu\text{g/mL}$ de eugenol respetivamente; D- C₆-HSL extraída sem exposição ao eugenol; E- PBS; F – poço vazio; G – C₆-HSL sintética a 0,12 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$.

As três estirpes de *P. aeruginosa* em estudo obtiveram os resultados ilustrados na Figura 3.5.3.1., ou seja, todas as concentrações de eugenol testadas (131,36; 164,2 e 328,4

µg/mL) inibiram a síntese de homosserina nas três estirpes de *P. aeruginosa*. Descarta-se a eventualidade de um erro técnico durante a extração da C₆-HSL pois o poço D, referente à C₆-HSL extraída de cultura de *P. aeruginosa* sem exposição ao eugenol, demonstra a eficiência da extração através do halo violeta presente em torno do mesmo. Este halo violeta é indicador da presença de C₆-HSL exógena (extraída das culturas de *P. aeruginosa* não expostas ao eugenol) como já foi referido anteriormente (secção 3.5.2). Pelo mesmo motivo é excluída a possibilidade de as três estirpes de *P. aeruginosa* não estarem a produzir a homosserina. Por outro lado, pode verificar-se também que o sistema de percepção de quórum do biossensor se encontrava ativo e funcional, pois este reconheceu a homosserina exógena produzida por *P. aeruginosa* e a homosserina exógena sintética (ilustrado pela presença de um halo violeta nos poços D e G).

A inibição da síntese de homosserina nas três estirpes de *P. aeruginosa* em estudo é indicadora do efeito inibidor que o eugenol tem sobre o sistema de percepção de quórum desta bactéria. À semelhança dos resultados obtidos por Norizan et al. (2013), que verificou o potencial da cafeína como inibidor da percepção de quórum em *P. aeruginosa* PAO1, também o eugenol demonstrou não degradar a homosserina, mas sim inibir a sua produção nas três estirpes de *P. aeruginosa* utilizadas neste estudo.

3.6. Avaliação do impacto da adaptação ao eugenol na virulência de *P. aeruginosa* recorrendo ao modelo *Galleria mellonella*

A expressão de fatores de virulência por *P. aeruginosa* é um processo no qual a percepção de quórum tem um papel muito importante, tal como descrito em estudos anteriores (Jimenez et al. 2012; Pearson et al. 2000; Zhu et al. 2015). Tendo em consideração que na avaliação do impacto da adaptação ao eugenol, no sistema de PQ de *P. aeruginosa*, este composto revelou ter um efeito inibitório sobre a produção de homosserina nas três estirpes de *P. aeruginosa*, foi lógico avaliar se uma exposição prévia e contínua a concentrações de eugenol sub-letais (1313,6 µg/mL) contribuiriam para uma redução no potencial de virulência. Para isso, recorreu-se ao modelo de *Galleria mellonella*. As larvas de *G. mellonella* foram infetadas com cada uma das três estirpes de *P. aeruginosa* previamente adaptadas ao eugenol, durante três passagens seriadas. Após a adaptação foram infetadas 10 larvas com cerca de 10⁶UFC/larva para as estirpes *P.*

aeruginosa DSM 939, ATCC 27853 e UAlg 114. A observação da sobrevivência das larvas ao longo dos 5 dias está representada na Figura 3.6.1.

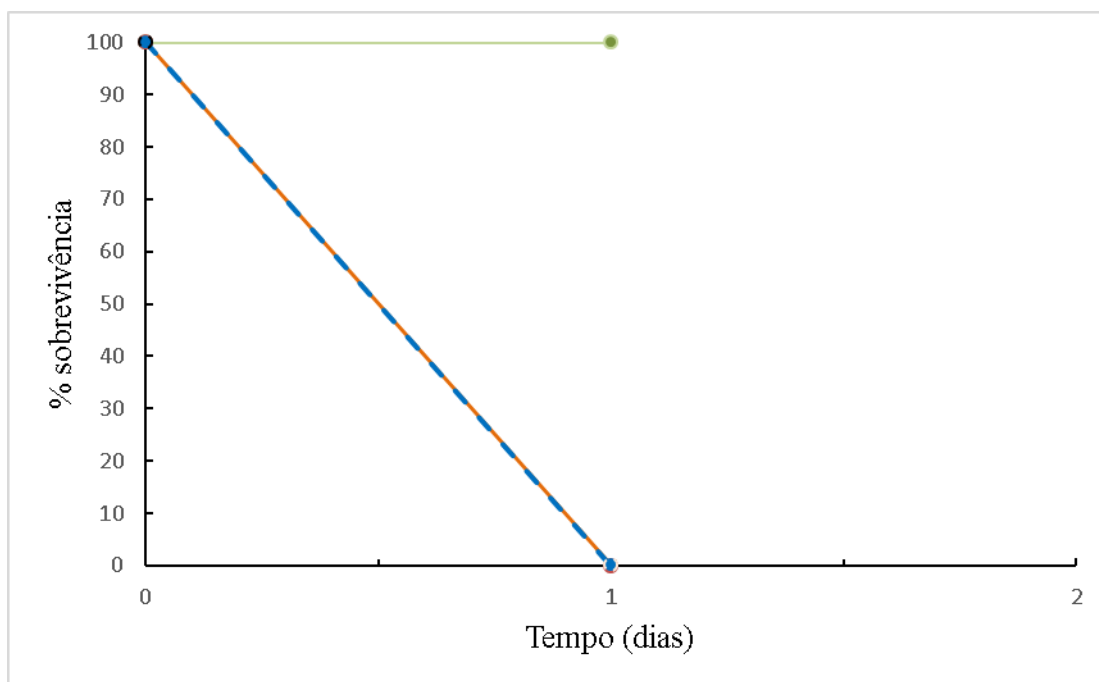


Figura 3.6.1 - Sobrevivência das larvas inoculadas com as células adaptadas (—●—) (1313,6 µg/mL de eugenol) e não adaptadas (—●—) (sem tratamento com eugenol) de *P. aeruginosa*. (—●—) representa as larvas injetadas unicamente com PBS (controle). Estes resultados são representativos das três estirpes de *P. aeruginosa* em estudo. Os valores expressos representam a média de três réplicas independentes. As barras de erro representam o valor do desvio padrão.

Com base nos resultados obtidos é possível observar que todas as larvas morreram 24 horas após a infecção com qualquer uma das estirpes de *P. aeruginosa* quer adaptadas ao eugenol ou não adaptadas. Apenas as larvas injetadas com PBS (controle) sobreviveram mantendo-se em perfeitas condições. Contudo, verificaram-se algumas diferenças na melanização das larvas entre as larvas infetadas com as células adaptadas e não adaptadas. O processo de melanização da hemolinfa em *G. mellonella* traduz-se pelo aumento de pigmentação escura nas larvas devido à produção de peptídeos antimicrobianos como resposta à infecção. As larvas infetadas com as células não adaptadas apresentaram uma melanização muito mais acentuada (cor mais negra) e severa do que as larvas infetadas com as estirpes adaptadas ao eugenol (Figura 3.6.2). Esta observação leva a crer que o eugenol teve algum efeito atenuador no potencial de virulência de *P. aeruginosa*.

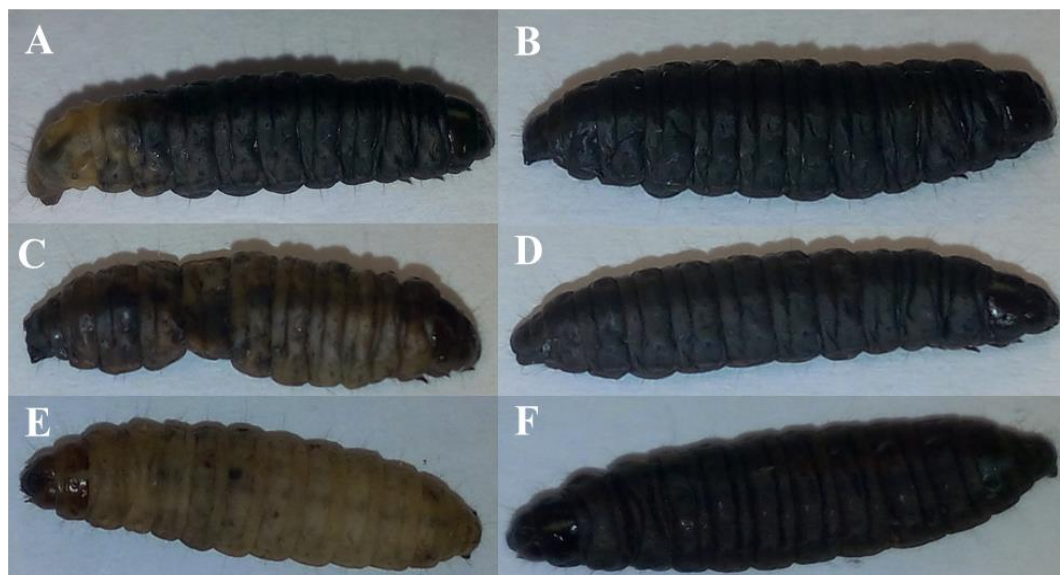


Figura 3.6.2 – Melanização em *G. mellonella* 24 horas após a infecção com as três estirpes de *P. aeruginosa* adaptadas e não adaptadas ao eugenol. Larvas infetadas com: A- *P. aeruginosa* DSM 939 adaptada; B- *P. aeruginosa* DSM 939 não adaptada; C- *P. aeruginosa* ATCC 27853 adaptada; D- *P. aeruginosa* ATCC 27853 não adaptada; E- *P. aeruginosa* UAlg 114 adaptada; F- *P. aeruginosa* UAlg 114 não adaptada.

Durante o processo de infecção das larvas, observou-se que as larvas infetadas com as estirpes não adaptadas ao eugenol tiveram uma ação muito mais rápida e severa no desencadeamento do sistema imunitário (visível pela melanização das larvas). Algumas larvas ficaram completamente melanizadas e inertes numa questão de minutos. As estirpes adaptadas ao eugenol tiveram o mesmo tipo de efeito nas larvas mas não de uma forma tão imediata. Por este motivo pensa-se que seria interessante realizar um ensaio em que o acompanhamento e observação das larvas pós infecção seja feita em tempo real. A existir algum efeito inibitório do eugenol na virulência de *P. aeruginosa*, este efeito só será evidente nas primeiras horas após a infecção. Como o modo de ação desta bactéria é extremamente rápido e severo, ao fim das primeiras 24 horas após a infecção não é possível discernir diferenças ou semelhanças na virulência das estirpes adaptadas e não adaptadas ao eugenol. É possível, pois concluir que apesar do eugenol à concentração de 1313,6 $\mu\text{g/mL}$ inibir o sistema de PQ esta inibição não é suficientemente eficaz para diminuir a expressão dos fatores de virulência de *P. aeruginosa*.

4. Conclusões

Com este trabalho pretendeu-se determinar a atividade antibacteriana de dois componentes naturalmente presentes no extrato do fruto de *A. unedo*, o ácido gálico e o ácido ferúlico, contra três estirpes de *P. aeruginosa*. Em paralelo, pretendeu-se determinar a atividade antibacteriana de um outro componente natural, o eugenol, componente maioritário no óleo essencial de cravinho contra as mesmas três estirpes de *P. aeruginosa*. Dado que o ácido ferúlico comprovou ter uma atividade antibacteriana mais eficaz a concentrações mais baixas prosseguiu-se o trabalho com este componente e o eugenol. Assim, pretendeu-se ainda avaliar a aquisição de respostas de tolerância de *P. aeruginosa* quando exposta de modo contínuo a estes compostos. Avaliou-se o efeito da adaptação na suscetibilidade a um conjunto de antibióticos atualmente utilizados na terapêutica e na virulência *in vivo* no modelo *G. mellonella*. Dada a elevada capacidade de formação de biofilme desta bactéria e sendo a percepção de quórum um dos mecanismos responsáveis pela comunicação bacteriana e com um papel crucial na diferenciação de biofilme, foi ainda estudado o potencial destes componentes na inibição da percepção de quórum.

A determinação da atividade antibacteriana dos dois componentes presentes no extrato do fruto de *A. unedo* demonstrou que o ácido ferúlico tem um efeito inibitório mais eficaz a concentrações mais baixas contra as três estirpes bacterianas estudadas. Os valores de CMI obtidos pelo método de microdiluição foram entre 800 e 900 µg/mL de ácido ferúlico e entre 3000 e 3500 µg/mL de ácido gálico. Relativamente ao eugenol, os valores de CMI obtidos pelo método de microdiluição foram entre 656,8 e 1313,6 µg/mL. Os valores de CMB para estes três componentes também foram diferentes sendo que o eugenol e o ácido ferúlico revelaram ter um efeito bactericida contra as três estirpes de *P. aeruginosa* a concentrações muito similares, 1970,4 µg/mL de eugenol e 2000 µg/mL de ácido ferúlico. O valor CMB para o ácido gálico variou entre 4000 e 5000 µg/mL, ou seja, mais do dobro do valor CMB obtido para o ácido ferúlico.

Relativamente à aquisição de tolerância aos componentes estudados, foi verificado que a exposição contínua das três estirpes em estudo a concentrações sequenciais e crescentes de ácido ferúlico ou eugenol, não conduziu a nenhum decréscimo de suscetibilidade aos mesmos. Quer as células adaptadas ao ácido ferúlico quer as células adaptadas ao eugenol toleraram a exposição contínua a concentrações sub-letais de cada

componente, ou seja, concentrações inferiores aos valores CMI obtidos, o que apoia a hipótese da não aquisição de tolerância aos componentes naturais. Contudo, a adaptação a concentrações sub-letais de ácido ferúlico conduziu a alterações no perfil de suscetibilidade à eritromicina nas três estirpes estudadas. Embora o perfil de suscetibilidade aos restantes antibióticos testados se tenha mantido inalterado, verificou-se ainda o surgimento de colónias resistentes à ceftriaxona nas estirpes DSM 939 e ATCC 27853. A adaptação a concentrações sub-letais de eugenol não provocou alterações no perfil de suscetibilidade aos antibióticos testados com exceção da estirpe UAlg 114 que se tornou resistente à ciprofloxacina após exposição à concentração mais elevada que foi tolerada pela estirpe. Assim sendo, a exposição contínua ao eugenol induziu resistência à ciprofloxacina na estirpe UAlg 114 mas não induziu resistência ou proteção aos outros dois antibióticos testados nem ao próprio eugenol.

Em relação ao efeito da adaptação ao eugenol no sistema de PQ, observou-se um efeito inibidor do eugenol sobre o sistema de PQ através da inibição da síntese de homoserina nas três estirpes de *P. aeruginosa* em estudo.

Relativamente ao efeito da adaptação ao eugenol no potencial de virulência no modelo *G. mellonella*, não se observou qualquer alteração na mortalidade das larvas infetadas com células adaptadas. Contudo, verificou-se durante o procedimento diferenças na melanização das larvas infetadas com células adaptadas quando comparadas com as larvas infetadas com células não adaptadas. Assim, embora a adaptação ao eugenol não tenha conduzido a alterações na mortalidade das larvas coloca-se a hipótese de que possa ter um efeito atenuante sobre a virulência no modelo *G. mellonella*. É possível concluir que apesar de a adaptação ao eugenol ter um efeito inibitório sobre o sistema de PQ esta inibição não é suficientemente eficaz para diminuir a expressão dos fatores de virulência de *P. aeruginosa*.

Podemos concluir que o ácido ferúlico e o eugenol são dois agentes antibacterianos eficazes a concentrações relativamente baixas e que a exposição contínua a estes dois componentes não induz respostas de tolerância aos próprios componentes nem à maioria dos antibióticos testados. A aquisição de resistência à ciprofloxacina (como consequência da adaptação da estirpe UAlg 114 ao eugenol) e à eritromicina (como consequência da adaptação das três estirpes ao ácido ferúlico) deve ser alvo de estudo mais detalhado. Seria interessante verificar se ocorre aquisição de resistência a antibióticos da mesma classe de forma que estes dois componentes possam ser utilizados como agentes antibacterianos de um modo seguro.

Futuramente, será interessante explorar se a exposição a estes dois componentes tem algum efeito ao nível da inibição da aderência de forma a avaliar a sua utilização como agentes antibiofilme. Seria também interessante avaliar se existe interação sinérgica entre os componentes estudados e antibióticos. Além disso, seria útil avaliar em tempo real se o eugenol tem algum efeito no potencial de virulência *in vivo*. O limite de tempo e de recursos não nos permitiu testar a atividade do ácido ferúlico no sistema de PQ nem no potencial de virulência *in vivo*, por isso, seria interessante fazê-lo em estudos futuros.

5. Referências Bibliográficas

- Aaron, Shawn D., Wendy Ferris, Karam Ramotar, Katherine Vandemheen, Francis Chan, e Raphael Saginur. 2002. «Single and combination antibiotic susceptibilities of planktonic adherent, and biofilm-grown *Pseudomonas aeruginosa* isolates cultured from sputa of adults with cystic fibrosis.» *Journal of Clinical Microbiology* 40 (11): 4172–4179. doi:10.1128/JCM.40.11.4172-4179.2002.
- Abedon, Stephen T., Sarah J. Kuhl, Bob G. Blasdel, e Elizabeth Martin Kutter. 2011. «Phage treatment of human infections.» *Bacteriophage* 1 (2): 66–85. doi:10.4161/bact.1.2.15845.
<http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.4161/bact.1.2.15845>.
- Agents, Antimicrobial, Haluk Vahaboglu, Figen Coskuncan, e Ozlem Tansel. 2001. «Clinical importance of extended-spectrum β -lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* strains.» *Journal of Medical Microbiology* 50 (2001): 642–645.
- Ali, Shaik Mahaboob, Aleem a Khan, Irshad Ahmed, M Musaddiq, Khaja S Ahmed, H Polasa, L Venkateswar Rao, Chittoor M Habibullah, Leonardo a Sechi, e Niyaz Ahmed. 2005. «Antimicrobial activities of Eugenol and Cinnamaldehyde against the human gastric pathogen *Helicobacter pylori*.» *Annals of clinical microbiology and antimicrobials* 4: 20. doi:10.1186/1476-0711-4-20.
- Andrade, Daniela, Cristina Gil, Luiza Breitenfeld, Fernanda Domingues, e Ana Paula Duarte. 2009. «Bioactive extracts from *Cistus ladanifer* and *Arbutus unedo* L.» *Industrial Crops and Products* 30: 165–167. doi:10.1016/j.indcrop.2009.01.009.
- Antunes, Maria D, Custodia M Gago, Ana M Cavaco, e Maria G Miguel. 2012. «Edible coatings enriched with essential oils and their compounds for fresh and fresh-cut fruit.» *Recent patents on food, nutrition & agriculture* 4 (2): 114–22. doi:10.2174/2212798411204020114.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22640404>.
- APERIS, G, B BURGWYNFUCHS, C ANDERSON, J WARNER, S CALDERWOOD, e E MYLONAKIS. 2007. «*Galleria mellonella* as a model host to study infection by the *Francisella tularensis* live vaccine strain.» *Microbes and Infection* 9 (6): 729–734. doi:10.1016/j.micinf.2007.02.016.
<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1286457907000974>.

- Apolónio, Joana, Maria L. Faleiro, Maria G. Miguel, e Luís Neto. 2014. «No induction of antimicrobial resistance in *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes* during continuous exposure to eugenol and citral.» *FEMS Microbiology Letters* 354: 92–101. doi:10.1111/1574-6968.12440.
- Barbosa, FC, MP Mayer, E Saba-Chujfi, e S Cai. 2001. «Subgingival occurrence and antimicrobial susceptibility of enteric rods and pseudomonads from Brazilian periodontitis patients» (33): 306–310.
- Bassler, Bonnie L. 1999. «How bacteria talk to each other: Regulation of gene expression by quorum sensing.» *Current Opinion in Microbiology* 2 (6): 582–587. doi:10.1016/S1369-5274(99)00025-9.
- Bodey, Gerald, e Ricardo Bolivar. 1983. «Infections caused by *Pseudomonas aeruginosa*.» *Review of Infectious diseases* 5 (2): 279–313. doi:10.1093/clinids/5.2.279.
- Borges, Anabela, Carla Ferreira, Maria J Saavedra, e Manuel Simões. 2013. «Antibacterial activity and mode of action of ferulic and gallic acids against pathogenic bacteria.» *Microbial drug resistance (Larchmont, N.Y.)* 19 (4): 256–65. doi:10.1089/mdr.2012.0244. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23480526>.
- Borges, Anabela, Maria J. Saavedra, e Manuel Simões. 2012. «The activity of ferulic and gallic acids in biofilm prevention and control of pathogenic bacteria.» *Biofouling* 28 (February): 755–767. doi:10.1080/08927014.2012.706751.
- Breidenstein, Elena B.M., César de la Fuente-Núñez, e Robert E.W. Hancock. 2011. «*Pseudomonas aeruginosa*: all roads lead to resistance.» *Trends in Microbiology* 19 (8): 419–426. doi:10.1016/j.tim.2011.04.005. <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0966842X11000862>.
- Brudzynski, Katrina. 2006. «Effect of hydrogen peroxide on antibacterial activities of Canadian honeys.» *Canadian journal of microbiology* 52 (12): 1228–1237. doi:10.1139/w06-086.
- Buer, Jan, e Rudi Balling. 2003. «Mice, microbes and models of infection.» *Nature Reviews Genetics* 4 (3): 195–205. doi:10.1038/nrg1019. <http://www.nature.com/doifinder/10.1038/nrg1019>.
- Bush, Karen, Patrice Courvalin, Gautam Dantas, Julian Davies, Barry Eisenstein, Pentti Huovinen, George A. Jacoby, et al. 2011. «Tackling antibiotic resistance.» *Nature Reviews Microbiology* 9 (12): 894–896. doi:10.1038/nrmicro2693. <http://www.nature.com/doifinder/10.1038/nrmicro2693>.

- Cabot, Gabriel, Laura Zamorano, Bartolomé Moyà, Carlos Juan, Alfonso Navas, Jesús Blázquez, e Antonio Oliver. 2016. «Evolution of *Pseudomonas aeruginosa* antimicrobial resistance and fitness under low and high mutation supply rates». *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* (January): AAC.02676–15. doi:10.1128/AAC.02676-15. <http://aac.asm.org/lookup/doi/10.1128/AAC.02676-15>.
- Campos, F. M., J. A. Couto, A. R. Figueiredo, I. V. T??th, A. O S S Rangel, e T. A. Hogg. 2009. «Cell membrane damage induced by phenolic acids on wine lactic acid bacteria.» *International Journal of Food Microbiology* 135 (2): 144–151. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2009.07.031. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2009.07.031>.
- Carlet, Jean, Vincent Jarlier, Stephan Harbarth, Andreas Voss, Herman Goossens, e Didier Pittet. 2012. «Ready for a world without antibiotics? The Pensières Antibiotic Resistance Call to Action.» *Antimicrobial Resistance and Infection Control* 1 (1): 11. doi:10.1186/2047-2994-1-11. <http://www.aricjournal.com/content/1/1/11>.
- Carmen, J, B Roeder, J Nelson, R Robisonogilvie, R Robison, G Schaalje, e W Pitt. 2005. «Treatment of biofilm infections on implants with low-frequency ultrasound and antibiotics.» *American Journal of Infection Control* 33 (2): 78–82. doi:10.1016/j.ajic.2004.08.002. <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0196655304005747>.
- Castro, William, Maribel Navarro, e Christophe Biot. 2013. «Medicinal potential of ciprofloxacin and its derivatives.» *Future medicinal chemistry* 5 (1): 81–96. doi:10.4155/fmc.12.181. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23256815>.
- Daglia, Maria. 2012. «Polyphenols as antimicrobial agents.» *Current Opinion in Biotechnology* 23 (2): 174–181. doi:10.1016/j.copbio.2011.08.007. <http://dx.doi.org/10.1016/j.copbio.2011.08.007>.
- Davies, D. G. 1998. «The Involvement of Cell-to-Cell Signals in the Development of a Bacterial Biofilm.» *Science* 280 (5361): 295–298. doi:10.1126/science.280.5361.295. <http://www.sciencemag.org/cgi/doi/10.1126/science.280.5361.295>.

- de la Fuente-Núñez, César, Fany Reffuveille, Lucía Fernández, e Robert EW Hancock. 2013. «Bacterial biofilm development as a multicellular adaptation: antibiotic resistance and new therapeutic strategies.» *Current Opinion in Microbiology* 16 (5): 580–589. doi:10.1016/j.mib.2013.06.013. <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1369527413000891>.
- Edwards-Jones, Valerie. 2013. *Alternative Antimicrobial Approaches to Fighting Multidrug-Resistant Infections. Fighting Multidrug Resistance with Herbal Extracts, Essential Oils and their Components*. Elsevier. doi:10.1016/B978-0-12-398539-2.00001-X. <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-398539-2.00001-X>.
- EUCAST. 2015. «Antimicrobial susceptibility testing EUCAST disk diffusion method - Version 5.0.» *European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* (January).
- Fadli, M., J. Chevalier, L. Hassani, N. E. Mezrioui, e J. M. Pagès. 2014. «Natural extracts stimulate membrane-associated mechanisms of resistance in Gram-negative bacteria.» *Letters in Applied Microbiology* 58: 472–477. doi:10.1111/lam.12216.
- Faleiro, Leonor, Graça Miguel, Sónia Gomes, Ludmila Costa, Florencia Venâncio, Adriano Teixeira, a. Cristina Figueiredo, José G. Barroso, e Luis G. Pedro. 2005. «Antibacterial and antioxidant activities of essential oils isolated from *Thymbra capitata* L. (Cav.) and *Origanum vulgare* L.» *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53: 8162–8168. doi:10.1021/jf0510079.
- Faleiro M.L. 2011. «The mode of antibacterial action of essential oils.» *Science against microbial pathogens: communicating current research and technological advances* 3 (3): 1143–1156.
- Faleiro, M.L., e M.G. Miguel. 2013. *Use of Essential Oils and Their Components against Multidrug-Resistant Bacteria. Fighting Multidrug Resistance with Herbal Extracts, Essential Oils and their Components*. Elsevier. doi:10.1016/B978-0-12-398539-2.00006-9. <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780123985392000069>.
- Fisher, K., C. Rowe, e C. a. Phillips. 2007. «The survival of three strains of *Arcobacter butzleri* in the presence of lemon, orange and bergamot essential oils and their components in vitro and on food.» *Letters in Applied Microbiology* 44 (5): 495–499. doi:10.1111/j.1472-765X.2006.02106.x. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17451515>.

- Fleiszig, Suzanne MJ, e David J Evans. 2014. «The pathogenesis of bacterial keratitis: studies with *Pseudomonas aeruginosa*.» *Product Sheet* (September): 1–2. http://www.lgcstandards-atcc.org/products/all/27853.aspx?geo_country=de#generalinformation.
- Folkesson, Anders, Lars Jelsbak, Lei Yang, Helle Krogh Johansen, Oana Ciofu, Niels Højby, e Søren Molin. 2012. «Adaptation of *Pseudomonas aeruginosa* to the cystic fibrosis airway: an evolutionary perspective.» *Nature Reviews Microbiology* 10 (12): 841–51. doi:10.1038/nrmicro2907. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23147702>.
- Fonseca, António Pedro, Petra Correia, João Carlos Sousa, e Rogério Tenreiro. 2007. «Association patterns of *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates as revealed by virulence traits, antibiotic resistance, serotype and genotype». *FEMS Immunology & Medical Microbiology* 51 (3): 505–516. doi:10.1111/j.1574-695X.2007.00328.x. <http://femsim.oxfordjournals.org/cgi/doi/10.1111/j.1574-695X.2007.00328.x>.
- Fortalezas, Sofia, Lucélia Tavares, Rui Pimpão, Meenu Tyagi, Vera Pontes, Paula M. Alves, Gordon Mcdougall, Derek Stewart, Ricardo B. Ferreira, e Cláudia N. Santos. 2010. «Antioxidant properties and neuroprotective capacity of strawberry tree fruit (*Arbutus unedo*).» *Nutrients* 2: 214–229. doi:10.3390/nu2020214.
- Fricks-Lima, J., C.M. Hendrickson, M. Allgaier, H. Zhuo, J.P. Wiener-Kronish, S.V. Lynch, e K. Yang. 2011. «Differences in biofilm formation and antimicrobial resistance of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from airways of mechanically ventilated patients and cystic fibrosis patients.» *International Journal of Antimicrobial Agents* 37 (4): 309–315. doi:10.1016/j.ijantimicag.2010.12.017. <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0924857911000392>.
- Gellatly, Shaan L., e Robert E.W. Hancock. 2013. «*Pseudomonas aeruginosa*: new insights into pathogenesis and host defenses». *Pathogens and Disease* 67 (3): 159–173. doi:10.1111/2049-632X.12033. <http://femspd.oxfordjournals.org/cgi/doi/10.1111/2049-632X.12033>.
- Giannouli, Maria, Anna Palatucci, Valentina Rubino, Giuseppina Ruggiero, Marco Romano, Maria Triassi, Vittorio Ricci, e Raffaele Zarrilli. 2014. «Use of larvae of the wax moth *Galleria mellonella* as an in vivo model to study the virulence of *Helicobacter pylori*.» *BMC Microbiology* 14 (1): 228. doi:10.1186/s12866-014-0228-0. <http://www.biomedcentral.com/1471-2180/14/228>.

- Gill, Alexander O, e Richard a Holley. 2004. «Mechanisms of bactericidal action of cinnamaldehyde against *Listeria monocytogenes* and of eugenol against *L. monocytogenes* and LaGill, A. O., & Holley, R. a. (2004). Mechanisms of bactericidal action of cinnamaldehyde against *Listeria monocytogenes* and of.» *Applied and environmental microbiology* 70 (10): 5750–5755. doi:10.1128/AEM.70.10.5750.
- Gómez, Marisa I, e Alice Prince. 2007. «Opportunistic infections in lung disease: *Pseudomonas* infections in cystic fibrosis.» *Current opinion in pharmacology* 7 (3): 244–251. doi:10.1016/j.coph.2006.12.005.
- Hammer, Katherine a., Christine F. Carson, e Thomas V. Riley. 2012. «Effects of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) essential oil and the major monoterpene component terpinen-4-ol on the development of single- and multistep antibiotic resistance and antimicrobial susceptibility.» *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 56: 909–915. doi:10.1128/AAC.05741-11.
- Hardalo, C, e S C Edberg. 1997. «*Pseudomonas aeruginosa*: assessment of risk from drinking water.» *Critical reviews in microbiology* 23 (1): 47–75. doi:10.3109/10408419709115130.
- Harmsen, Morten, Liang Yang, Sünje J. Pamp, e Tim Tolker-Nielsen. 2010. «An update on *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation, tolerance, and dispersal.» *FEMS Immunology & Medical Microbiology*: no–no. doi:10.1111/j.1574-695X.2010.00690.x. <http://femsim.oxfordjournals.org/cgi/doi/10.1111/j.1574-695X.2010.00690.x>.
- Heinonen, Marina. 2007. «Antioxidant activity and antimicrobial effect of berry phenolics--a Finnish perspective.» *Molecular nutrition & food research* 51 (6) (Junho): 684–91. doi:10.1002/mnfr.200700006. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17492800>.
- Hemaiswarya, S., e M. Doble. 2009. «Synergistic interaction of eugenol with antibiotics against Gram negative bacteria.» *Phytomedicine* 16 (11): 997–1005. doi:10.1016/j.phymed.2009.04.006. <http://dx.doi.org/10.1016/j.phymed.2009.04.006>.

- Hentzer, Morten, Hong Wu, Jens Bo Andersen, Kathrin Riedel, Thomas B Rasmussen, Niels Bagge, Naresh Kumar, et al. 2003. «Attenuation of *Pseudomonas aeruginosa* virulence by quorum sensing inhibitors.» *The EMBO journal* 22 (15): 3803–15. doi:10.1093/emboj/cdg366.
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=169039&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Hill, Lucy, Neyme Veli, e Peter J. Coote. 2014. «Evaluation of *Galleria mellonella* larvae for measuring the efficacy and pharmacokinetics of antibiotic therapies against *Pseudomonas aeruginosa* infection.» *International Journal of Antimicrobial Agents* 43 (3): 254–261. doi:10.1016/j.ijantimicag.2013.11.001.
<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0924857913003841>.
- Hoiby, Niels, Thomas Bjarnsholt, Michael Givskov, Soren Molin, e Oana Ciofu. 2010. «Antibiotic resistance of bacterial biofilms.» *International journal of antimicrobial agents* 35 (4): 322–332. doi:10.1016/j.ijantimicag.2009.12.011.
- Jakobsen, T. H., M. van Gennip, R. K. Phipps, M. S. Shanmugham, L. D. Christensen, M. Alhede, M. E. Skindersoe, et al. 2012. «Ajoene, a Sulfur-Rich Molecule from Garlic, Inhibits Genes Controlled by Quorum Sensing.» *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 56 (5): 2314–2325. doi:10.1128/AAC.05919-11.
<http://aac.asm.org/cgi/doi/10.1128/AAC.05919-11>.
- Jakobsen, Tim Holm, Thomas Bjarnsholt, Peter Østrup Jensen, Michael Givskov, e Niels Høiby. 2013. «Targeting quorum sensing in.» *Future microbiology*: 901–921.
- Jakobsen, Tim Holm, Steinn Kristinn Bragason, Richard Kerry Phipps, Louise Dahl Christensen, Maria van Gennip, Morten Alhede, Mette Skindersoe, et al. 2012. «Food as a source for quorum sensing inhibitors: Iberin from horseradish revealed as a quorum sensing inhibitor of *Pseudomonas aeruginosa*.» *Applied and Environmental Microbiology* 78 (7): 2410–2421. doi:10.1128/AEM.05992-11.
- Jander, G, L G Rahme, e F M Ausubel. 2000. «Positive correlation between virulence of *Pseudomonas aeruginosa* mutants in mice and insects.» *Journal of bacteriology* 182 (13): 3843–5. doi:10.1128/JB.182.13.3843-3845.2000.
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=94559&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.

- Jayaraman, Premkumar, Meena K. Sakharkar, Chu Sing Lim, Thean Hock Tang, e Kishore R. Sakharkar. 2010. «Activity and interactions of antibiotic and phytochemical combinations against *Pseudomonas aeruginosa* in vitro.» *International Journal of Biological Sciences* 6 (6): 556–568.
- Jeppsson, Bengt, Peter Mangell, e Henrik Thorlacius. 2011. «Use of probiotics as prophylaxis for postoperative infections.» *Nutrients* 3 (5): 604–12. doi:10.3390/nu3050604. <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-79958034988&partnerID=tZOtx3y1>.
- Jesaitis, Algirdas J, Michael J Franklin, Deborah Berglund, Maiko Sasaki, Connie I Lord, Justin B Bleazard, James E Duffy, Haluk Beyenal, e Zbigniew Lewandowski. 2003. «Compromised host defense on *Pseudomonas aeruginosa* biofilms: characterization of neutrophil and biofilm interactions.» *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 171 (8): 4329–4339. doi:10.4049/jimmunol.171.8.4329.
- Kerr, K G, e A M Snelling. 2009. «*Pseudomonas aeruginosa*: a formidable and ever-present adversary.» *Journal of Hospital Infection* 73: 338–344. doi:10.1016/j.jhin.2009.04.020.
- LaBauve, Annette E., e Matthew J. Wargo. 2012. «Growth and Laboratory Maintenance of *Pseudomonas aeruginosa*». *Current Protocols in Microbiology* (May): 1–8. doi:10.1002/9780471729259.mc06e01s25. <http://doi.wiley.com/10.1002/9780471729259.mc06e01s25>.
- Lau, Gee W., Daniel J. Hassett, Huimin Ran, e Fansheng Kong. 2004. «The role of pyocyanin in *Pseudomonas aeruginosa* infection.» *Trends in Molecular Medicine* 10 (12): 599–606. doi:10.1016/j.molmed.2004.10.002. <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1471491404002606>.
- Lawrence, Rubina, e Ebenezer Jeyakumar. 2013. «Antimicrobial Resistance: A Cause for Global Concern.» *BMC Proceedings* 7 (Suppl 3): S1. doi:10.1186/1753-6561-7-S3-S1. <http://www.biomedcentral.com/1753-6561/7/S3/S1>.
- Lister, Philip D, Daniel J Wolter, e Nancy D Hanson. 2009. «Antibacterial-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: clinical impact and complex regulation of chromosomally encoded resistance mechanisms.» *Clinical microbiology reviews* 22 (4): 582–610. doi:10.1128/CMR.00040-09. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2772362&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.

- Liu, P V. 1974. «Extracellular toxins of *Pseudomonas aeruginosa*.» *The Journal of infectious diseases* 130 Suppl (November): S94–S99.
- Malheiro, Ricardo, Olga Sá, Eric Pereira, Cristina Aguiar, Paula Baptista, e José Alberto Pereira. 2012. «*Arbutus unedo* L. leaves as source of phytochemicals with bioactive properties.» *Industrial Crops and Products* 37 (1): 473–478. doi:10.1016/j.indcrop.2011.07.023. <http://dx.doi.org/10.1016/j.indcrop.2011.07.023>.
- Manach, Claudine, Augustin Scalbert, Christine Morand, Christian Rémésy, e Liliana Jiménez. 2004. «Polyphenols: Food sources and bioavailability.» *American Journal of Clinical Nutrition* 79: 727–747.
- Mancuso, Cesare, e Rosaria Santangelo. 2014. «Ferulic acid: Pharmacological and toxicological aspects.» *Food and Chemical Toxicology* 65: 185–195. doi:10.1016/j.fct.2013.12.024. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fct.2013.12.024>.
- Marinelli, Laura J, Sorel Fitz-gibbon, e Clarmyra Hayes. 2012. «Propionibacterium acnes Bacteriophages Display Limited Genetic» 3 (5): 1–13. doi:10.1128/mBio.00279-12.Editor.
- Matsuo, Yasuhiro, Shima Eda, Nobuyuki Gotoh, Eisaku Yoshihara, e Taiji Nakae. 2004. «MexZ-mediated regulation of mexXY multidrug efflux pump expression in *Pseudomonas aeruginosa* by binding on the mexZ-mexX intergenic DNA.» *FEMS Microbiology Letters* 238 (1): 23–28. doi:10.1016/j.femsle.2004.07.010.
- Mcclean, Kay H, Michael K Winson, Leigh Fish, Adrian Taylor, Siri Ram Chhabra, Miguel Camara, Mavis Daykin, et al. 1997. «Quorum sensing and *Chromobacterium violaceum*: exploitation of violacein production and inhibition for the detection of N-acylhomoserine lactones.» *Microbiology* 143 (1 997): 3703–3711. doi:10.1099/00221287-143-12-3703.
- McDougald, Diane, Scott a. Rice, Nicolas Barraud, Peter D. Steinberg, e Staffan Kjelleberg. 2011. «Should we stay or should we go: mechanisms and ecological consequences for biofilm dispersal.» *Nature Reviews Microbiology* 10 (1): 39–50. doi:10.1038/nrmicro2695. <http://dx.doi.org/10.1038/nrmicro2695>.
- McPhee, J. B., M. Bains, G. Winsor, S. Lewenza, A. Kwasnicka, M. D. Brazas, F. S. L. Brinkman, e R. E. W. Hancock. 2006. «Contribution of the PhoP-PhoQ and PmrA-PmrB Two-Component Regulatory Systems to Mg²⁺-Induced Gene Regulation in *Pseudomonas aeruginosa*.» *Journal of Bacteriology* 188 (11): 3995–4006. doi:10.1128/JB.00053-06. <http://jb.asm.org/cgi/doi/10.1128/JB.00053-06>.

- McPhee, Joseph B., Shawn Lewenza, e R. E W Hancock. 2003. «Cationic antimicrobial peptides activate a two-component regulatory system, PmrA-PmrB, that regulates resistance to polymyxin B and cationic antimicrobial peptides in *Pseudomonas aeruginosa*.» *Molecular Microbiology* 50 (1): 205–217. doi:10.1046/j.1365-2958.2003.03673.x.
- Mena, Kristina D, e Charles P Gerba. 2009. «Risk assessment of *Pseudomonas aeruginosa* in water.» *Reviews of environmental contamination and toxicology*. doi:10.1007/978-1-4419-0032-6_3.
- Micek, Scott T, Richard G Wunderink, Marin H Kollef, Catherine Chen, Jordi Rello, Jean Chastre, Massimo Antonelli, et al. 2015. «An international multicenter retrospective study of *Pseudomonas aeruginosa* nosocomial pneumonia: Impact of multidrug resistance.» *Critical care (London, England)* 19 (1): 219. doi:10.1186/s13054-015-0926-5.
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4446947&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Miguel, Maria, Maria Faleiro, Adriana Guerreiro, e Maria Antunes. 2014. «*Arbutus unedo* L.: Chemical and Biological Properties.» *Molecules* 19: 15799–15823. doi:10.3390/molecules191015799. <http://www.mdpi.com/1420-3049/19/10/15799/>.
- Miguel, Maria G., Leonor Faleiro, Maria D. Antunes, Smail Aazza, Joana Duarte, e Ana R. Silvério. 2013. «Antimicrobial, antiviral and antioxidant activities of “água-mel” from Portugal.» *Food and Chemical Toxicology* 56: 136–144. doi:10.1016/j.fct.2013.02.007. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fct.2013.02.007>.
- Mylonakis, Eleftherios, Roberto Moreno, Joseph B El, Alexander Idnurm, Joseph Heitman, B Stephen, Frederick M Ausubel, Andrew Diener, Joseph B El Khoury, e Stephen B Calderwood. 2005. «*Galleria mellonella* as a model system to study *Cryptococcus neoformans* pathogenesis.» *Infection and immunity* 73 (7): 3842–2850. doi:10.1128/IAI.73.7.3842.
- Nadal Jimenez, P., G. Koch, J. A. Thompson, K. B. Xavier, R. H. Cool, e W. J. Quax. 2012. «The Multiple Signaling Systems Regulating Virulence in *Pseudomonas aeruginosa*.» *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 76 (1): 46–65. doi:10.1128/MMBR.05007-11.
<http://mmbbr.asm.org/cgi/doi/10.1128/MMBR.05007-11>.

- Nam, You Sun, Sun Young Cho, Hee Young Yang, Kyung Sun Park, Ji Hyun Jang, Yun Tae Kim, Joo Won Jeong, Jin Tae Suh, e Hee Joo Lee. 2013. «Investigation of mutation distribution in DNA gyrase and topoisomerase IV genes in ciprofloxacin-non-susceptible Enterobacteriaceae isolated from blood cultures in a tertiary care university hospital in South Korea, 2005-2010.» *International Journal of Antimicrobial Agents* 41 (2): 126–129. doi:10.1016/j.ijantimicag.2012.10.004. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2012.10.004>.
- Nathwani, Dilip, Gowri Raman, Katherine Sulham, Meghan Gavaghan, e Vandana Menon. 2014. «Clinical and economic consequences of hospital-acquired resistant and multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* infections: a systematic review and meta-analysis.» *Antimicrobial resistance and infection control* 3 (1): 32. doi:10.1186/2047-2994-3-32. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4219028&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Nohynek, Liisa J, Hanna-leena Alakomi, Marja P Kähkönen, Marina Heinonen, M Ilkka, Riitta H Puupponen-pimiä, e Ilkka M Helander. 2006. «Berry Phenolics: Antimicrobial Properties and Mechanisms of Action Against Severe Human Pathogens Berry Phenolics : Antimicrobial Properties and Mechanisms of Action Against Severe Human Pathogens.» *Nutrition and Cancer* 54 (1) (July 2015): 37–41. doi:10.1207/s15327914nc5401.
- Norizan, Siti Nur Maisarah, Wai Fong Yin, e Kok Gan Chan. 2013. «Caffeine as a potential quorum sensing inhibitor.» *Sensors (Basel, Switzerland)* 13 (4): 5117–5129. doi:10.3390/s130405117.
- O’Loughlin, C. T., L. C. Miller, A. Siryaporn, K. Drescher, M. F. Semmelhack, e B. L. Bassler. 2013. «A quorum-sensing inhibitor blocks *Pseudomonas aeruginosa* virulence and biofilm formation.» *Proceedings of the National Academy of Sciences* 110 (44): 17981–17986. doi:10.1073/pnas.1316981110. <http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1316981110>.
- Ou, Shiyi, e Kin Chor Kwok. 2004. «Ferulic acid: Pharmaceutical functions, preparation and applications in foods.» *Journal of the Science of Food and Agriculture* 84 (February): 1261–1269. doi:10.1002/jsfa.1873.

- Pavlovskis, O R, e B Wretlind. 1979. «Assessment of protease (elastase) as a *Pseudomonas aeruginosa* virulence factor in experimental mouse burn infection.» *Infection and immunity* 24 (1): 181–7. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=414281&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Pearson, J P, M Feldman, B H Iglewski, e A Prince. 2000. «*Pseudomonas aeruginosa* Cell-to-Cell Signaling Is Required for Virulence in a Model of Acute Pulmonary Infection.» *Infect Immun* 68 (7): 4331–4334.
- Peleg, Anton Y, Divya Monga, Satish Pillai, Eleftherios Mylonakis, Robert C Moellering, e George M Eliopoulos. 2009. «Reduced susceptibility to vancomycin influences pathogenicity in *Staphylococcus aureus* infection.» *The Journal of infectious diseases* 199 (4): 532–6. doi:10.1086/596511. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3750955&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Pereira, Ana Paula, Isabel C F R Ferreira, Filipa Marcelino, Patricia Valentão, Paula B Andrade, Rosa Seabra, Leticia Estevinho, Albino Bento, e José Alberto Pereira. 2007. «Phenolic compounds and antimicrobial activity of olive (*Olea europaea* L. Cv. Cobrançosa) leaves.» *Molecules (Basel, Switzerland)* 12 (5): 1153–1162. doi:10.3390/12051153.
- Radji, Maksum, Rafael Adi Agustama, Berna Elya, e Conny Riana Tjampakasari. 2013. «Antimicrobial activity of green tea extract against isolates of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and multi-drug resistant *Pseudomonas aeruginosa*.» *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine* 3 (8): 663–667. doi:10.1016/S2221-1691(13)60133-1.
- Ramarao, Nalini, Christina Nielsen-Leroux, e Didier Lereclus. 2012. «The insect *Galleria mellonella* as a powerful infection model to investigate bacterial pathogenesis.» *Journal of visualized experiments: JoVE* (70): e4392. doi:10.3791/4392. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3567165&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.

- Robertson, Danielle M., Quinn M. Parks, Robert L. Young, Jennifer Kret, Katie R. Poch, Kenneth C. Malcolm, David P. Nichols, et al. 2011. «Disruption of Contact Lens–Associated *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms Formed in the Presence of Neutrophils». *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 52 (5): 2844. doi:10.1167/iovs.10-6469.
<http://iovs.arvojournals.org/article.aspx?doi=10.1167/iovs.10-6469>.
- Ruiz-Rodríguez, Brígida María, Concepción Sánchez-Moreno, Begoña De Ancos, María De Cortes Sánchez-Mata, Virginia Fernández-Ruiz, Montaña Cámara, e Javier Tardío. 2014. «Wild *Arbutus unedo* L. and *Rubus ulmifolius* Schott fruits are underutilized sources of valuable bioactive compounds with antioxidant capacity.» *Fruits* 69 (6): 435–448. doi:10.1051/fruits/2014035.
<http://www.fruits-journal.org/10.1051/fruits/2014035>.
- Sarjit, Amreeta, Yi Wang, e Gary a Dykes. 2015. «Antimicrobial activity of gallic acid against thermophilic *Campylobacter* is strain specific and associated with a loss of calcium ions.» *Food microbiology* 46: 227–33. doi:10.1016/j.fm.2014.08.002.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25475290>.
- Schuster, Martin, C Phoebe Lostroh, Tomoo Ogi, e E P Greenberg. 2003. «Identification, timing, and signal specificity of *Pseudomonas aeruginosa* quorum-controlled genes: a transcriptome analysis.» *Journal of bacteriology* 185 (7): 2066–2079. doi:10.1128/JB.185.7.2066.
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=151497&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Schweizer, Herbert P. 2003. «Efflux as a mechanism of resistance to antimicrobials in {*Pseudomonas aeruginosa*} and related bacteria: unanswered questions.» *Genet Mol Res* 2 (1): 48–62. doi:S01 [pii].
- Shrout, Joshua D., David L. Chopp, Collin L. Just, Morten Hentzer, Michael Givskov, e Matthew R. Parsek. 2006. «The impact of quorum sensing and swarming motility on *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation is nutritionally conditional.» *Molecular Microbiology* 62 (5): 1264–1277. doi:10.1111/j.1365-2958.2006.05421.x. <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-2958.2006.05421.x>.
- Smith, Roger S, Sarah G Harris, Richard Phipps, e Barbara Iglewski. 2002. «The *Pseudomonas aeruginosa* Quorum Sensing Molecule N-(3-Oxododecanoyl) Homoserine Lactone Contributes to Virulence and Induces Inflammation In Vivo.» *J Bacteriol* 184 (4): 1132. doi:10.1128/JB.184.4.1132.

- Soto, Sara M. 2013. «Role of efflux pumps in the antibiotic resistance of bacteria embedded in a biofilm.» *Virulence* 4 (3): 223–9. doi:10.4161/viru.23724. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3711980&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Spencer, R C. 1996. «Predominant Pathogens Found in the European Prevalence of Infection in Intensive Care Study.» *J. Clin. Microbiol. Infect. Dis* 15 (15): 281–285.
- Stewart, Philip S., e J. William Costerton. 2001. «Antibiotic resistance of bacteria in biofilms.» *Lancet* 358 (9276): 135–138. doi:10.1016/S0140-6736(01)05321-1.
- Stieritz, D D, e I A Holder. 1975. «Experimental studies of the pathogenesis of infections due to *Pseudomonas aeruginosa*: description of a burned mouse model.» *J Infect Dis* 131 (6): 688–691. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=805812.
- Strateva, T., e D. Yordanov. 2009. «*Pseudomonas aeruginosa* - a phenomenon of bacterial resistance.» *Journal of Medical Microbiology* 58 (9): 1133–1148. doi:10.1099/jmm.0.009142-0. <http://jmm.microbiologyresearch.org/content/journal/jmm/10.1099/jmm.0.009142-0>.
- Sun, Xiuxiu, Zhe Wang, Hoda Kadouh, e Kequan Zhou. 2014. «The antimicrobial, mechanical, physical and structural properties of chitosan-gallic acid films.» *LWT - Food Science and Technology* 57 (1): 83–89. doi:10.1016/j.lwt.2013.11.037. <http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2013.11.037>.
- Szajdek, Agnieszka, e E. J. Borowska. 2008. «Bioactive compounds and health-promoting properties of Berry fruits: A review.» *Plant Foods for Human Nutrition* 63 (4): 147–153. doi:10.1007/s11130-008-0097-5.
- Takahashi, Hajime, Tomomi Takahashi, Satoko Miya, Haruka Yokoyama, Takashi Kuda, e Bon Kimura. 2015. «Growth Inhibition Effects of Ferulic Acid and Glycine/Sodium Acetate on *Listeria monocytogenes* in Coleslaw and Egg Salad.» *Food Control*. doi:10.1016/j.foodcont.2015.03.037. <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S095671351500211X>.
- Teixeira, Ana, Nieves Baenas, Raul Dominguez-Perles, Ana Barros, Eduardo Rosa, Diego A. Moreno, e Cristina Garcia-Viguera. 2014. «Natural bioactive compounds from winery by-products as health promoters: A review.» *International Journal of Molecular Sciences* 15 (9): 15638–15678. doi:10.3390/ijms150915638.

- Van Heeckeren, Anna, Ronald Walenga, Michael W. Konstan, Tracey Bonfield, Pamela B. Davis, e Thomas Ferkol. 1997. «Excessive inflammatory response of cystic fibrosis mice to bronchopulmonary infection with *Pseudomonas aeruginosa*.» *Journal of Clinical Investigation* 100 (11): 2810–2815. doi:10.1172/JCI119828.
- Vandeputte, Olivier M, Martin Kiendrebeogo, Sanda Rajaonson, Billo Diallo, Adeline Mol, Mondher El Jaziri, e Marie Baucher. 2010. «Identification of catechin as one of the flavonoids from *Combretum albiflorum* bark extract that reduces the production of quorum-sensing-controlled virulence factors in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1.» *Applied and environmental microbiology* 76 (1): 243–53. doi:10.1128/AEM.01059-09.
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2798626&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Wagner, Victoria E., e Barbara H. Iglewski. 2008. «*P. aeruginosa* Biofilms in CF Infection.» *Clinical Reviews in Allergy & Immunology* 35 (3): 124–134. doi:10.1007/s12016-008-8079-9. <http://link.springer.com/10.1007/s12016-008-8079-9>.
- Walsh, S. E., J. Y. Maillard, a. D. Russell, C. E. Catrenich, D. L. Charbonneau, e R. G. Bartolo. 2003. «Activity and mechanisms of action of selected biocidal agents on Gram-positive and -negative bacteria.» *Journal of Applied Microbiology* 94 (2): 240–247. doi:10.1046/j.1365-2672.2003.01825.x.
- Zhu, Jie, Xiaoqing Cai, Tyler L. Harris, Major Gooyit, Malcolm Wood, Matthew Lardy, e Kim D. Janda. 2015. «Disarming *Pseudomonas aeruginosa* Virulence Factor LasB by Leveraging a *Caenorhabditis elegans* Infection Model.» *Chemistry & Biology* 22 (4): 483–491. doi:10.1016/j.chembiol.2015.03.012.
<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1074552115001052>.