



Controle da formação de biofilme

por *Pseudomonas aeruginosa*

Débora Godoi Souza de Almeida^{1*}(IC) Ananda da Silva Braga²(IC), Caio César Andrade³, Roberta Signini⁴(PQ), Maísa Borges da Costa⁴(PQ), Plínio Lázaro Faleiro Naves⁴(PQ). E-mail: deboragodoi@outlook.com

¹ Universidade Estadual de Goiás - Campus de Ciências Exatas e Tecnológicas da UEG.

Resumo: Biofilmes são descritos como sendo uma forma de vida microbiana sésil, caracterizada por células, que estão irreversivelmente aderidas a uma superfície biótica ou abiótica, sendo circundados por uma complexa matriz de substâncias poliméricas extracelulares, que aumentam a resistência dessas células contra a ação de agentes químicos, como antibióticos, detergentes e antissépticos. *Pseudomonas aeruginosa* é um micro-organismo caracterizado por grande aptidão para formar biofilmes, sendo um patógeno oportunista e nosocomial frequente, responsável por infecções em diversos sítios do corpo humano, particularmente em pacientes imunocomprometidos. O controle microbiano nas infecções hospitalares está ligado a formação de biofilmes bacterianos em dispositivos implantados e residentes, assim como a dificuldade de erradicação na antibioticoterapia. Apesar do esforço contínuo para o desenvolvimento de novos tratamentos, apenas um número limitado dos agentes antimicrobianos é eficaz no controle de processos infecciosos, sobretudo os causados por micro-organismos associados a biofilmes. Neste contexto este projeto avaliou a atividade inibitória de compostos quitosânicos-guanidínicos sobre a formação de biofilme por *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 em microplacas de poliestireno.

Palavras-chave: Biofilme. *Pseudomonas aeruginosa*. Compostos quitosano-guanidínicos.

Introdução

Biofilmes são sistemas biológicos formados por comunidades de células agregadas, organizadas e funcionais embebidas em matriz extracelular composta por substâncias poliméricas, a qual possibilita a aderência irreversível a superfícies bióticas ou abióticas (DONLAN & COSTERTON, 2002). A associação dos organismos em biofilmes constitui uma forma de proteção ao seu desenvolvimento, fomentando relações simbióticas e permitindo a sobrevivência em ambientes hostis (SALDANHA, 2013; KASNOWSKI, et al. 2010).

Pseudomonas aeruginosa é um micro-organismo com grande aptidão para formar biofilmes e este processo ocorre com frequência em pacientes hospitalizados e representa um aumento dos riscos de hospitalização principalmente para pacientes

REALIZAÇÃO



debilitados ou imunocomprometidas o que complica o tratamento das infecções hospitalares. Outro agravante é o fato que seu genoma alberga genes que conferem resistência aos antimicrobianos que torna a terapia contra este patógeno desafiadora devido à falta de novas terapêuticas antimicrobianas. (FREITAS, SAND e SIMONETT, 2010; FUENTEFRIA, et.al, 2008.)

Infecções por biofilmes microbianos são geralmente tratadas clinicamente com combinações de antibióticos em altas doses. No entanto, a administração de múltiplos antibióticos para controlar infecções tende a induzir a resistência bacteriana e a formação de biofilmes recalcitrantes, além de gerar intolerância tóxica. Este rápido desenvolvimento de resistência bacteriana para muitos dos antibióticos existentes provoca uma contínua busca de novos e mais eficazes produtos antimicrobianos (SALDANHA, 2013).

Neste contexto, o uso de compostos de origem natural representa uma estratégia interessante no controle da formação de biofilmes microbianos. A quitosana, β (1-4)-2-amino-2-desoxi-D-glicose, que é o principal derivado da quitina, é um material de baixo custo, obtido de rejeitos da indústria pesqueira que possui inúmeras propriedades (SILVA, SANTOS e FERREIRA, 2006; JAYAKUMAR et al., 2007) e tem se demonstrado como uma alternativa viável, seja pela sua disponibilidade ou pela sua ação contra alguns micro-organismos (ABREU et al., 2013).

Como pontos positivos, a quitosana apresenta características como a biocompatibilidade e atoxidade. Portanto, torna-se possível seu uso como em produtos de aplicação farmacêutica e médica, na forma de comprimidos, hidrogéis ou filmes, sendo esta última de maior relevância devido à ação microbiana que estes filmes proporcionam (DIAS et al., 2013; SHAHZADI et al., 2016).

No intuito de melhorar as limitações apresentadas por sua solubilidade, algumas modificações químicas são propostas objetivando conservar ou potencializar suas propriedades e ampliar a sua faixa de solubilidade (ZHAO-SHENG et al., 2012). Entre as reações possíveis, destacam-se as de sulfatação, carboxialquilação, quaternização, e reações de guanilação e guanidinilação, dentre outras (ROBERTS, 1992).



O grupo funcional guanidina desempenha um papel importante em sistemas biológicos, por isso está presente em muitos compostos de uma vasta gama de atividades farmacológicas (LEVALLET, LERPINIÈRE, KO, 1997). Dentre suas aplicações, os grupos guanidínicos podem-se destacar por seu uso como inibidor da gripe, bloqueadores neuronais de canais de cálcio e sódio, agentes anticonvulsivantes, agentes cardiotônicos, agentes anti-inflamatórios e agentes antimicrobianos (CUNHA et al., 2005; NGAMGA et al., 2007; OHARA et al., 2009).

A busca de novas alternativas no controle de micro-organismos patogênicos constitui um crescente campo de estudo e dentre as novas abordagens encontra-se a investigação da ação antimicrobiana e inibitória da expressão de fatores de virulência por compostos purificados e modificados de origem natural objetivando o desenvolvimento de inovadoras ferramentas terapêuticas com atividades farmacológicas complementares ao arsenal disponível de drogas convencionais (BROWN et al., 2008; CEGELSKI et al., 2008).

Material e Métodos

Micro-organismos utilizados no estudo

Foram utilizadas cepas padrão de *Pseudomonas aeruginosa* American Type Culture Collection (ATCC 9027) provenientes da coleção do Laboratório de Microbiologia da Universidade Estadual de Goiás (UEG – CCET).

A manutenção das cepas foi realizada conforme descrito por Silva, Costa e Chinarelli (2008) com pequenas modificações. Primeiramente, foram realizados repique das cepas a fim de se obterem colônias isoladas. As cepas foram repicadas em meio sólido ágar cetrimida, pela técnica de esgotamento por estrias e as placas incubadas a 35°C por 24 horas. Logo em seguida, foram transferidas de 3 a 5 colônias isoladas e típicas para um tubo com 15 mL de caldo BHI (*Brain Heart Infusion*) + 20% de glicerol, seguidas de homogeneização em agitador de tubos (vórtex) por 15 segundos, após este procedimento os tubos foram incubados por 12 horas a 35°C. Em seguida, foram transferidas alíquotas de 1 mL para microtubos tipo

REALIZAÇÃO

Eppendorf, previamente esterilizados e devidamente rotulados. Posteriormente as alíquotas foram armazenadas a 8° C por sete dias e congeladas em freezer a -20°C.

As cepas foram reativadas em ágar cetrimida, pela técnica do esgotamento. As placas foram semeadas com auxílio de alças de platina e em seguida incubadas a 35°C por 24 horas.

Inibição da formação de biofilmes "*in vitro*": determinação da biomassa total (polissacarídeos e bactérias)

Foi utilizada a metodologia descrita por Stepanovic et al. (2004) com algumas modificações. Resumidamente, as colônias de *Pseudomonas aeruginosa* foram suspensas em 5 mL de solução fisiológica estéril 0,9 % e a suspensão foi ajustada a escala 0,5 McFarland ($1,5 \times 10^8$ UFC mL⁻¹). Em seguida foi transferido 1 mL da suspensão para 9 mL o caldo de Soja Trypticaseína (TSB) (1/10), ajustando o inóculo para $1,5 \times 10^7$ UFC mL⁻¹.

Depois, em cada poço de uma microplaca de poliestireno, contendo 100 µL do meio de cultura TSB, foram colocados 5 µL da suspensão celular para o crescimento do biofilme (1×10^5 UFC/mL), exceto nos poços de controle de esterilidade e de solventes, no qual foram colocados 100 µL de meio de cultura e os respectivos solventes. Os compostos testados foram Quito-guani 6B, Quito-guani 6H, Quito-guani 6I, com concentrações previamente definidas com ensaios de CL₅₀ para a avaliação da atividade inibitória dos compostos na formação de biofilmes bacterianos.

Compostos	CL ₅₀ (mgL ⁻¹)	Nível de Toxicidade
Quito-guani 6B (Tiogui 2)	1202	Baixa
Quito-guani 6H (Tiogui 8)	2124	Baixa
Quito-guani 6I (Tiogui 9)	2100	Baixa

Tabela 1: Compostos isolados testados

As microplacas foram incubadas no intervalo de 24h, após este período foi feita a leitura visual. Em seguida, foram realizadas as leituras das densidades ópticas (DO) a 630 nm dos poços, posteriormente os meios de cultura foram



retirados dos poços, e lavado três vezes com 200 μ L com solução fisiológica estéril para a remoção das células não aderidas.

Posteriormente, as placas foram tratadas segundo metodologia descrita por Naves et al. (2008). Resumidamente, foram adicionados 110 μ L de cristal violeta a 1% por 10 minutos, em seguida o corante foi desprezado e as placas lavadas cinco vezes com 200 μ L de água destilada. As placas foram secadas a 35°C por 20 minutos, posteriormente foram adicionados 110 μ L de etanol absoluto em cada poço para a coloração das bactérias aderidas e a placa incubada durante 10 minutos. Posteriormente, foram realizadas as leituras das densidades ópticas (DO) a 492 nm dos poços.

A partir das densidades ópticas obtidas foram calculadas a formação de biofilme pela seguinte fórmula: $FB = BA - PC$ (NAVES, 2009). Sendo que FB corresponde à formação do biofilme, BA é a densidade óptica a 492nm dos poços com as bactérias aderidas, PC representa as densidades ópticas dos poços controle não inoculados.

A porcentagem de inibição da formação do biofilme foi calculada ao comparar a média dos valores de absorbância obtidos com o crescimento do biofilme tratado pelos compostos isolados e em combinação em relação aos valores de absorbância obtidos para os poços controle não inoculados.

Análises estatísticas

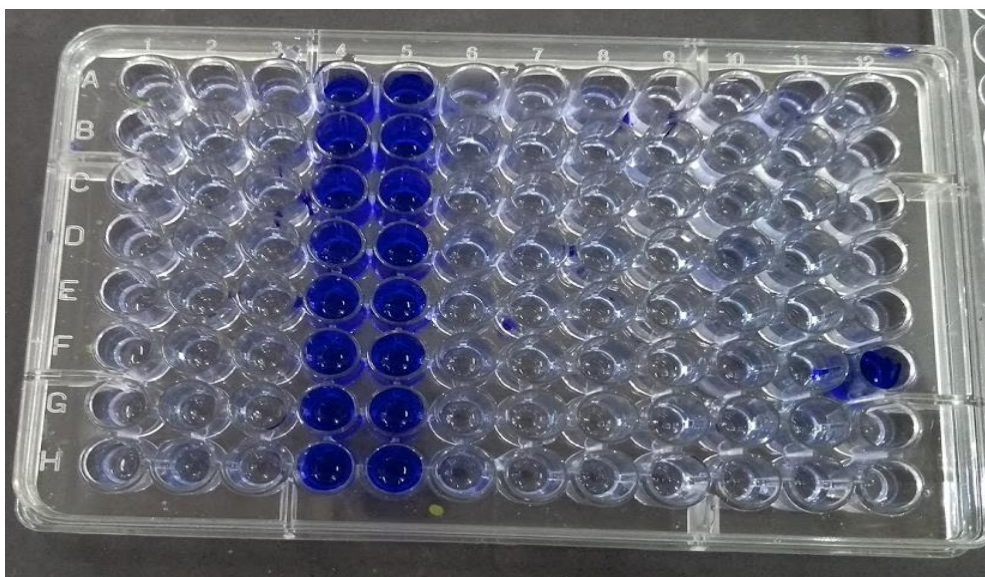
Todos os experimentos foram realizados em triplicata e em ensaios independentes. As variáveis quantitativas geradas como os índices de formação de biofilmes e atividade inibitória da formação de biofilme foram analisadas descritivamente com o cálculo das médias e desvios padrão. Para avaliar o significado das diferenças entre a formação de biofilme na presença e na ausência dos compostos para a biomassa foi utilizado o teste t de Student pareado bicaudal ($p < 0,01$).

Resultados e Discussão



A *Pseudomonas aeruginosa* possui características que as posicionam entre as principais bactérias com habilidade de formar biofilme, uma vez que as condições para otimizar esta habilidade foram definidas no outro projeto do grupo, foi avaliada a atividade inibitória de compostos quitosânicos-guanidínicos nas concentrações previamente estudadas.

Figura 1: Leitura visual da formação de biofilme em microplaca na presença de compostos quitosânico-guanidínicos.



À partir da imagem observa-se que houve crescimento microbiano somente nas colunas 4 e 5 onde apresenta-se coloração roxa devido a fixação do corante cristal violeta no biofilme formado, nas outras colunas onde não houve crescimento e formação de biofilme permaneceu incolor.

Os resultados da leitura da densidade óptica em espectrofotômetro estão expressos na tabela 2.

Tabela 2: Inibição de biofilmes "*in vitro*" em microplacas na presença de compostos quitosânico-guanidínicos.

Formação de Biofilme (Densidade óptica 492 nm)		
Compostos testados	Concentração CI_{50} (mg)	Pa 9027 (MED $\pm$ DP)



L ⁻¹)		
Quito-guani 6B	1202	0,01 ± 0,01
Quito-guani 6H	2124	0,01 ± 0,01
Quito-guani 6I	2100	0,02 ± 0,02
Diluyente	Solução aquosa de HCl 1%	0,01 ± 0,01
Controle de viabilidade	-	0,53 ± 0,15
Controle de esterilidade	-	0,05 ± 0,01

Os resultados obtidos expressaram inibição da biomassa total dos biofilmes na presença dos compostos quitosânico-guanidínicos. Porém, os compostos foram solúveis somente em meio ácido, sendo utilizado como diluyente, solução aquosa de HCl a 1%. Entretanto, a avaliação dos controles de diluyente demonstraram que o pH ácido necessário para a diluição dos compostos testados inibiu o crescimento bacteriano e, portanto, produziu resultados inconclusivos sobre a natureza da inibição da formação de biofilmes das pseudomonas.

Uma das limitações da quitosana é sua solubilidade em meios aquosos ligeiramente ácidos, e insolubilidade em meio neutros e alcalinos (ROBERTS, 1992), o que limita muitas de suas aplicações potenciais, dificultando assim a realização de testes biológicos. No intuito de melhorar as limitações apresentadas por sua solubilidade, algumas modificações químicas são propostas objetivando conservar ou potencializar suas propriedades e ampliar a sua faixa de solubilidade (ZHAO- SHENG et al., 2012).

Considerações Finais

O intuito do projeto foi analisar a atividade inibitória de alguns compostos quitosânicos-guanidínicos sobre a formação de biofilme, porém devido as limitações de solubilidade dos compostos em meios ácidos que interferiram diretamente nos resultados, os resultados da ação dos compostos sobre a formação de biofilme não permitiram uma análise conclusiva, sendo necessária a alteração do desenho experimental ou teste de outros compostos solúveis em condições fisiológicas de pH.



Agradecimentos

Agradeço meu orientador Prof. Dr. Plínio Lázaro Faleiro Naves, pela oportunidade e a UEG pelo investimento.

Referências

ABREU, F. O. M. S., CAVALCANTE, L. G., DOUDEMANT, P. V., CASTRO, A. M., NASCIMENTO, A. P. D., MATOS, J. E.; Propriedades e características da quitosana obtida a partir do exoesqueleto de caranguejo-uçá utilizando radiação de microondas. **Polímeros**, v.23, n.5, p. 630-635, 2013.

BROWN S.A, PALMER KL, WHITELEY M. **Revisiting the host as a growth medium**. Nature, 6: 657-666, 2008.

CUNHA, S., RODRIGUES, M. T., DA SILVA, C. C., NAPOLITANO, H. B., VENCATO, I., LARIUCCI, C.; The first synthesis of pyridinium N-benzoylguanidines by bismuth- and mercury-promoted guanylation of N-iminopyridinium ylide with thioureas. **Tetrahedron**, v. 61, n. 44, p. 10536-10540, 2005.

DIAS, K. B., SILVA, D. P., FERREIRA, L. A., FIDELIS, R. R., COSTA, J. D. L., DA SILVA, A. L. L., SCHEIDT, G. N.; Quitina e quitosana: Características, utilizações e perspectivas atuais de produção. **Journal of Biotechnology and Biodiversity**, v. 4, n. 3, 2013.

DONLAN, R.M.; COSTERTON, J.W. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. **ClinMicrobiol Rev**, 15, p.167-193, 2002.

FUENTEFRIA, D. B, et al. ***Pseudomonas aeruginosa*: disseminação de resistência antimicrobiana em efluente hospitalar e água superficial**. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical** , v. 41, n. 5, p. 470-3, 2008.

Freitas V.R., Van der Sand S.T. & Simonetti A.B. 2010. Formação *in vitro* de biofilme por *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus* na superfície de canetas odontológicas de alta rotação. Rev. Odontol. Unesp 39:4:193-200.



GONÇALVES, R. C. **Toxicidade e atividade inibitória da carboximetilquitosana isolada e em combinação com sais metálicos na formação de biofilmes por bactérias gram-negativa.** 2015. 78 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Moleculares) Universidade Estadual de Goiás - UEG-CCET, Goiás, 2015.

GURGEL, T. C.; CARVALHO, W. S. A. **Assistência Farmacêutica e o Aumento da Resistência Bacteriana aos Antimicrobianos.** *Latina Americana Journal of Pharmacy*, v.27, n.1, p.118-23, 2008.

JAYAKUMAR R, NWE N, TOKURA S, TAMURA H. Sulfated chitin and chitosan as novel biomaterials. **International Journal of Biological Macromolecules**, v.40, p.175-181, 2007.

KASNOWSKI, M. C, et al. **Formação de biofilme na indústria de alimentos e métodos de validação de superfícies.** *Revista científica eletrônica de medicina veterinária*, v. 8, n. 15, p.103-126, 2010.

LEVALLET, C., LERPINIÈRE, J., KO, S. Y.; The HgCl₂-promoted guanylation reaction: The scope and limitations. **Tetrahedron**, v. 53, n. 14, p. 5291-5304, 1997.

MASÁK, J. *et al.* **Pseudomonas biofilms: possibilities of their control.** *FEMS microbiology ecology*, v. 89, n. 1, p. 1-14, 2014.

MULCAHY, L. R.; VINCENT, I.M.; LEWIS, K. **Pseudomonas aeruginosa biofilms in disease.** *Microbial ecology*, v. 68, n. 1, p. 1-12, 2014.

NAVES, P. **Correlation between virulence factors and in vitro biofilm formation by *Escherichia coli* strains.** *Microb.Pathogen*, v.45, p.88-91, 2008.

NAVES, P. L. F. **Formación de biopelículas por “*Escherichia coli*” y su correlación com factores de virulência: Prevención y actividad de antimicrobianos frente a organismos.** Tesis Doctoral, Universidad Complutense de Madrid, Madrid, 2009.

NGAMGA, D., FREE, S. F., TANE, P., FOMUM, Z. T.; Millaurine A, a new guanidine alkaloid from seeds of *Millettia laurentii*. **Fitoterapia**, v. 78, n. 3, p. 276-277, 2007.



OHARA, K., VASSEUR, J.J., SMIETANA, M.; NIS-promoted guanylation of amines. **Tetrahedron Letters**, v. 50, n. 13, p. 1463-1465, 2009.

ROBERTS, G.A.F.; **Chitin Chemistry**. London: Macmillan, 1992.

SALDANHA, J. T. **Emprego de nanopartículas em estratégias de prevenção e tratamento de infecções relacionadas à formação de biofilmes bacterianos**.

Secretaria de educação profissional e tecnológica, instituto federal de educação, ciência e tecnologia do Rio de Janeiro 2013.

SHAHZADI, K., WU, L., GE, X., ZHAO, F., LI, H., PANG, S., JIANG, Y., GUAN, J., MU, X.; Preparation and characterization of bio-based hybrid film containing chitosan and silver nanowires. **Carbohydrate Polymers**, v. 137, p. 732-738, 2016.

SILVA, J. O, COSTA, P. P, CHINARELLI, S. H. **Manutenção de leveduras por congelamento a – 20°C**. RBAC, v.40, n.01, p.73-74, 2008.

SILVA HSRC, SANTOS KSCR, FERREIRA E. Quitosana: Derivados hidrossolúveis, aplicações farmacêuticas e avanços. **Química Nova**, v.29, n.4, p.776-785, 2006.

STEPANOVIĆ, S. et al. **Biofilm formation by Salmonella spp. and Listeria monocytogenes on plastic surface**. Letters in applied microbiology, v. 38, n. 5, p. 428-432, 2004.

ZHAO-SHENG, C., YUE-MING, S., CHUN-SHENG, Y., XUE-MEI, Z.; Preparation, characterization, and antibacterial activities of para-biguanidiny benzoyl chitosan

hydrochloride. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 125, n. 2, p. 1146-1151, 2012.