



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA E MEDICINA LEGAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA MÉDICA

CRISTER JOSÉ OCADAQUE

EFEITO DE BIOSURFACTANTE, DE INIBIDOR DE BOMBA DE EFLUXO E DE MODULADORES DE *QUORUM SENSING* SOBRE A SENSIBILIDADE ANTIMICROBIANA, A DINÂMICA DE BIOFILMES E A VIRULÊNCIA DE *Burkholderia pseudomallei*

FORTALEZA/CE

2020

EFEITO DE BIOSURFACTANTE, DE INIBIDOR DE BOMBA DE EFLUXO E DE MODULADORES DE *QUORUM SENSING* SOBRE A SENSIBILIDADE ANTIMICROBIANA, A DINÂMICA DE BIOFILMES E A VIRULÊNCIA DE *Burkholderia pseudomallei*

Tese apresentada ao Programa de Pós- Graduação em Microbiologia Médica da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para a defesa de Doutorado em Microbiologia Médica. Área de concentração: Microbiologia humana e animal
Orientadora: Profa. Dra. Débora Castelo Branco de Sousa Colares Maia.

FORTALEZA
2020

Página reservada para ficha catalográfica que deve ser confeccionada após apresentação e alterações sugeridas pela banca examinadora.

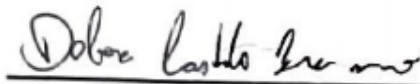
Para solicitar a ficha catalográfica de seu trabalho, acesse o site: www.biblioteca.ufc.br, clique no banner Catalogação na Publicação (Solicitação de ficha catalográfica)

EFEITO DE BISSURFACTANTE, DE INIBIDOR DE BOMBA DE EFLUXO E DE MODULADORES DE *QUORUM SENSING* SOBRE A SENSIBILIDADE ANTIMICROBIANA, A DINÂMICA DE BIOFILMES E A VIRULÊNCIA DE *Burkholderia pseudomallei*

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Médica da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para defesa do Doutorado em Microbiologia Médica.
Área de concentração: Microbiologia humana e animal.

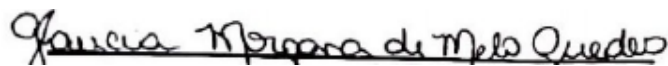
Data:20/02/2020

BANCA EXAMINADORA



Profa. Dra. Débora Castelo Branco de Souza Colares Maia (Orientadora)

Universidade Federal do Ceará (UFC)



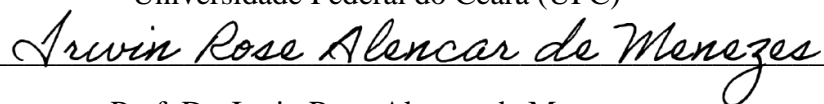
Prof. Dra. Gláucia Morgana de Melo Guedes

Universidade Federal do Ceará (UFC)



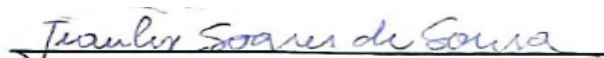
Dra. Silviane Praciano Bandeira

Universidade Federal do Ceará (UFC)



Prof. Dr. Irwin Rose Alencar de Menezes

Universidade Regional do Cariri (URCA)



Prof. Dr. Jeanlex Soares de Sousa

Universidade Federal do Ceará (UFC)

À Deus, pelo dom da vida.

Aos meus pais, por toda dedicação em construir o alicerce para que eu pudesse alcançar mais um degrau na minha profissão.

Aos meus irmãos, tios e amigos pela amizade, boas conversas e incentivo.

AGRADECIMENTO

À Fundação Cearense de Amparo e Pesquisa (FUNCAP) pelo apoio financeiro.

À Universidade Federal do Ceará (UFC) pelo espaço e infraestrutura disponibilizados.

À Central Analítica da UFC pelo apoio na análise das imagens de microscopia eletrônica.

Ao Centro Especializado em Micologia Médica (CEMM) pelos recursos destinados para concretização deste trabalho.

À Profa. Débora Castelo Branco de Sousa Colares Maia que dedicadamente me auxiliou a trilhar esse caminho no doutorado. Agradeço a confiança, incentivo, ensinamentos e mentoria, mesmo quando tem muito trabalho.

Ao Prof. Dr. José Júlio Costa Sidrim pelo empenho no crescimento do CEMM, proporcionando um ambiente de extrema qualidade, como o NB3, fundamental para a concretização deste trabalho.

Aos Professores do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Médica (PPGMM) que contribuíram para minha formação acadêmica e científica.

Aos professores Dra. Glaucia Morgana de Melo Guedes, Dra. Silviane Praciano Bandeira, Dr. Irwin Rose Alencar de Menezes, Dr. Jeanlex Soares de Sousa e Dra. Mirna Marques Bezerra Brayner por terem aceitado participar da banca de qualificação de doutorado, pelo tempo e pelas colaborações.

À secretária Carolinda Vilma Soares de Oliveira pela disponibilidade e atenção.

Aos colegas do GRAMM pelo convívio aprazível e contribuições na construção deste trabalho durante os 04 anos de parceria.

Aos demais alunos do PPGMM pelo apoio nas disciplinas cursadas.

Aos funcionários da Biblioteca de Ciências da Saúde- UFC, pela colaboração na obtenção de artigos científicos.

À Terezinha Rodrigues, técnico do setor de Micologia, pelo auxílio na execução desse estudo.

Aos meus pais, Duarte Ocadaque e Fatu Ocadaque, pelo amor incondicional e uma vida inteira de dedicação e carinho. Por entenderem as minhas faltas, sempre me motivarem na busca dos meus ideais e valorizarem as minhas conquistas.

Aos meus irmãos, Romano e Elizabete, pelos momentos de cumplicidade e incentivo.

À minha família pelo carinho e torcida.

A Deus pelas bênçãos concedidas em minha vida, por me guiar, iluminar e me dar tranquilidade para seguir em frente com os meus objetivos.

“Assumo consigo mesmo o compromisso de
estar constantemente melhorando.”

H. Jackson Brown,

RESUMO

Burkholderia pseudomallei é um patógeno bacteriano Gram-negativo, saprofítico, encontrado no solo e água de regiões tropicais e subtropicais, inclusive o Nordeste do Brasil. É o agente causal da melioidose e produz diversos fatores de virulência, incluindo biofilmes, proteases e sideróforos, os quais contribuem para sua patogenicidade. Ademais, é uma bactéria intrinsecamente resistente a muitos antibióticos, o que dificulta o tratamento. Nesse contexto, objetivou-se avaliar o efeito do biosurfactante ramnolipídio (9,765-5000 µg/mL), do inibidor de bombas de efluxo carbonilcianeto m-clorofenil-hidrazona (CCCP; 1-512 µM), dos inibidores de *quorum sensing* curcumina (1-512 µM) e furaneol (9,77-5000 µM) e da molécula de *quorum sensing* octanoil homoserina lactona (8HSL; 0,05-100 µM) sobre a sensibilidade antimicrobiana, a dinâmica de formação e manutenção de biofilmes e a virulência de *Burkholderia pseudomallei*. Para tanto, foram utilizadas 16 cepas de *B. pseudomallei* (8 clínicas e 8 ambientais) isoladas no estado do Ceará. Os experimentos seguiram as seguintes etapas: 1) avaliação da sensibilidade das cepas na forma planctônica e de biofilmes aos antimicrobianos e compostos isolados ou combinados; 2) investigação dos efeitos dos compostos sobre a formação e manutenção de biofilmes; 3) avaliação dos efeitos dos compostos sobre a produção de proteases e de sideróforos pelas cepas em ambas as formas de crescimento. Para tanto, as seguintes drogas foram utilizadas: doxiciclina (DOX), meropenem (MER), ceftazidima (CAZ), amoxicilina-clavulanato (AMC) e trimetoprim-sulfametoxazol (TSX). Assim, quando o ramnolipídio foi combinado com as drogas antibacterianas, esse causou reduções significativas ($P < 0,05$) nas concentrações inibitórias mínimas (CIMs) para MER, CAZ e SXT contra o crescimento planctônico, e reduções significativas ($P < 0,05$) nas concentrações eliminatórias mínimas do biofilme (CEMB) de MER e AMC. No tocante ao CCCP, observou-se uma redução ($P < 0,05$) nas CIMs de MER e CAZ e um aumento ($P < 0,05$) na CIM de AMC e uma redução ($P < 0,05$) nas CEMBs de MER, AMC e TSX. A curcumina, furaneol e 8HSL reduziram ($P < 0,05$) as CIMs de DOX, MER e CAZ, mas, aumentaram ($P < 0,05$) as CIMs de AMC. Ademais, curcumina reduziu ($P < 0,05$) CEMB de AMC, enquanto furaneol e 8HSL reduziram CEMBs de MER e AMC. Posteriormente, avaliou-se o efeito dos compostos sobre a formação de biofilmes e observou-se também que ramnolipídio e 8HSL não interferiram na formação de biofilmes de *B. pseudomallei*. Por outro lado, CCCP (128 µM), curcumina (51,3 µM) e furaneol (500 e 5000 µM) reduziram ($P < 0,05$) a formação de biofilmes por esse micro-organismo. Nesse sentido, quanto aos efeitos sobre os biofilmes maduros, ramnolipídio (78 e 780 µg/mL), CCCP (67, 133 e 530 µM), curcumina (51,2 e 512 µM) e furaneol (500 e 5000 µM) reduziram ($P < 0,05$) a biomassa dos biofilmes, enquanto 8HSL (78 µM) aumentou a biomassa dos biofilmes maduros. Em relação à produção de fatores de virulência, observou-se que, de maneira geral, o ramnolipídio aumentou ($P < 0,05$) a produção de proteases. CCCP, curcumina e furaneol reduziram ($P < 0,05$) a produção na forma planctônica durante a formação de biofilmes e no biofilme maduro, enquanto a 8HSL reduziu ($P < 0,05$) a produção de proteases pelos biofilmes em formação, mas aumentou ($P < 0,05$) pelos biofilmes maduros. Quanto aos sideróforos, ramnolipídio, CCCP, curcumina e 8HSL aumentaram ($P < 0,05$) a produção de sideróforos, enquanto o furaneol reduziu ($P < 0,05$). Diante do exposto, ramnolipídio, CCCP, curcumina e furaneol reduzem a biomassa de biofilmes de *B. pseudomallei*, sensibilizando-os às drogas antimicrobianas e interferindo com a produção de fatores de virulência. Esses resultados demonstram diferentes estratégias para a modulação de biofilmes de *B. pseudomallei* que podem vir a ser utilizadas no tratamento da melioidose.

Palavras-chave: *Burkholderia pseudomallei*; Ramnolipídeo; CCCP; Curcumina; Furaneol; 8HSL; Biofilmes; Proteases; Sideróforos.

ABSTRACT

Burkholderia pseudomallei is a Gram-negative, saprophytic bacterial pathogen found in soil and water in tropical and subtropical regions, including Northeast Brazil. It is the causal agent of melioidosis and produces several virulence factors, including biofilms, proteases and siderophores, which contribute to its pathogenicity. In addition, it is a bacterium intrinsically resistant to many antibiotics, which makes treatment difficult. In this context, the objective was to evaluate the effect of the biosurfactant rhamnolipid (9.765-5000 µg / mL), the inhibitor of carbonyl cyanide efflux pumps m-chlorophenylhydrazone (CCCP; 1-512 µM), the quorum sensing inhibitors curcumin (1 - 512 µM) and furaneol (9.77-5000 µM) and the quorum sensing octanoyl homoserin lactone molecule (8HSL; 0.05-100 µM) on antimicrobial sensitivity, the dynamics of biofilm formation and maintenance and the virulence of *Burkholderia pseudomallei*. For this, 16 strains of *B. pseudomallei* (8 clinical and 8 environmental) isolated in the state of Ceará were used. The experiments followed the following steps: 1) evaluation of the sensitivity of strains in planktonic form and biofilms to antimicrobials and isolated or combined compounds; 2) investigation of the effects of compounds on the formation and maintenance of biofilms; 3) evaluation of the effects of the compounds on the production of proteases and siderophores by the strains in both forms of growth. For that, the following drugs were used: doxycycline (DOX), meropenem (MER), ceftazidime (CAZ), amoxicillin-clavulanate (AMC) and trimethoprim-sulfamethoxazole (TSX). Thus, when rhamnolipid was combined with antibacterial drugs, it caused significant reductions ($P < 0.05$) in the minimum inhibitory concentrations (MICs) for MER, CAZ and SXT against planktonic growth, and significant reductions ($P < 0.05$) at the minimum biofilm eradication concentration (MBEC) of MER and AMC. Regarding the CCCP, there was a reduction ($P < 0.05$) in the CIMs of MER and CAZ and an increase ($P < 0.05$) in the CIM of AMC and a reduction ($P < 0.05$) in the MBECs of MER, AMC and TSX. Curcumin, furaneol and 8HSL reduced ($P < 0.05$) the CIMs of DOX, MER and CAZ, but, increased ($P < 0.05$) the CIMs of AMC. In addition, curcumin reduced ($P < 0.05$) MBECs for AMC, while furaneol and 8HSL reduced MBECs for MER and AMC. Subsequently, the effect of the compounds on the formation of biofilms was evaluated, and it was also observed that rhamnolipid and 8HSL did not interfere in the formation of *B. pseudomallei* biofilms. On the other hand, CCCP (128 µM), curcumin (51.3 µM) and furaneol (500 and 5000 µM) reduced ($P < 0.05$) the formation of biofilms by this microorganism. In this sense, as for the effects on mature biofilms, rhamnolipid (78 and 780 µg / mL), CCCP (67, 133 and 530 µM), curcumin (51.2 and 512 µM) and furaneol (500 and 5000 µM) reduced ($P < 0.05$) the biomass of biofilms, while 8HSL (78 µM) increased the biomass of mature biofilms. Regarding the production of virulence factors, it was observed that, in general, rhamnolipid increased ($P < 0.05$) the production of proteases. CCCP, curcumin and furaneol reduced ($P < 0.05$) production in planktonic form during biofilm formation and in mature biofilm, while 8HSL reduced ($P < 0.05$) protease production by biofilms in formation, but increased ($P < 0.05$) by mature biofilms. As for siderophores, rhamnolipid, CCCP, curcumin and 8HSL increased ($P < 0.05$) the production of siderophores, while furaneol reduced ($P < 0.05$). Given the above, rhamnolipid, CCCP, curcumin and furaneol reduce the biomass of *B. pseudomallei* biofilms, sensitizing them to antimicrobial drugs and interfering with the production of virulence factors. These results demonstrate different strategies for the modulation of *B. pseudomallei* biofilms that may be used in the treatment of melioidosis.

Keywords: *Burkholderia pseudomallei*; Rhamnolipid; CCCP; Curcumin; Furaneol; 8HSL; Biofilms; Proteases; Siderophores.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1-	Distribuição mundial de casos de melioidoses.....	24
Figura 2-	Distribuição de casos de melioidoses nas américas.....	25
Figura 3-	Distribuição de casos de melioidoses no Brasil.....	27
Figura 4-	Esfregaço de colônia corado pelo Gram (100X).....	28
Figura 5-	Diferentes formas de transmissão de <i>Burkholderia pseudomallei</i> .	30
Figura 6-	Manifestações clínicas da melioidose	35
Figura 7-	Identificação de colônias de <i>B. pseudomallei</i> em três tipos comuns de Agar.....	37
Figura 8-	Diferentes etapas de formação do biofilme.....	46
Figura 9-	Fluxograma do desenvolvimento da tese	63
Figura 10-	Visualização da placa de microdiluição de poliestireno com 96 poços de fundo chato com biofilme de <i>B. pseudomallei</i> após receber solução de resazurina a 0,025%	67
Figura 11-	Efeito do biossurfactante ramnolipídio sobre a formação de biofilme (A) e sobre o biofilme maduro (B) de <i>Burkholderia pseudomallei</i>	89
Figura 12-	Análise da microscopia confocal do ramnolipídio em biofilmes em formação e maduro de <i>B. pseudomallei</i>	90
Figura 13-	Detenção da biomassa pela fluorescência através do método de Ruby em biofilmes de <i>B. pseudomallei</i>	90
Figura 14-	Efeito do biossurfactante ramnolipídio sobre a produção de proteases por <i>Burkholderia pseudomallei</i> na planctônica (A), biofilme formação (B) e biofilme maduro (C).....	91
Figura 15-	Efeito do biossurfactante ramnolipídio sobre a produção de sideróforos por <i>Burkholderia pseudomallei</i> na forma planctônica (A), biofilme formação (B) e na forma de biofilme maduro (C).....	92
Figura 16-	Efeito do inibidor de bomba de efluxo carbonilcianeto m- clorofenil-hidrazona (CCCP) sobre a formação de biofilme (A) e sobre o biofilme maduro (B) de <i>Burkholderia pseudomallei</i>	93
Figura 17-	Análise da microscopia confocal do CCCP em biofilmes de <i>B. pseudomallei</i>	94
Figura 18-	Detenção da biomassa pela fluorescência através do método de Ruby em biofilmes de <i>B. pseudomallei</i> associado ao CCCP.....	94
Figura 19-	Efeito do inibidor de bomba de efluxo (CCCP) sobre a produção de proteases por <i>Burkholderia pseudomallei</i> na forma planctônica (A), biofilmes em formação (B) e na forma de biofilmemaduro (C).....	95

Figura 20-	Efeito do inibidor de bomba de efluxo (CCCP) sobre a produção de sideróforos por <i>Burkholderia pseudomallei</i> na forma planctônica (A), biofilmes em formação (B) e na forma de biofilme maduro (C).....	96
Figura 21-	Efeito do inibidor de <i>quorum sensing</i> curcumina sobre a formação de biofilme (A) e sobre o biofilme maduro (B) de <i>Burkholderia pseudomallei</i>	97
Figura 22-	Análise da microscopia confocal de curcumina associados aos biofilmes em formação e maduro de <i>B. pseudomallei</i>	98
Figura 23-	Detenção da biomassa pela fluorescência através do método de Ruby em biofilmes de <i>B. pseudomallei</i> associado a curcumina....	98
Figura 24-	Efeito do inibidor de <i>quorum sensing</i> curcumina sobre a produção de proteases por <i>Burkholderia pseudomallei</i> na forma planctônica (A) biofilmes em formação (B) biofilme maduro (C).....	99
Figura 25-	Efeito do inibidor de <i>quorum sensing</i> curcumina sobre a produção de sideróforos por <i>Burkholderia pseudomallei</i> na forma planctônica (A) biofilmes em formação (B) biofilme maduro (C).....	100
Figura 26-	Efeito do inibidor de <i>quorum sensing</i> furaneol sobre a formação de biofilme (A) e sobre o biofilme maduro (B) de <i>Burkholderia pseudomallei</i>	101
Figura 27-	Análise da microscopia confocal do furaneol associados aos biofilmes em formação e maduro de <i>B. pseudomallei</i>	102
Figura 28-	Detenção da biomassa pela fluorescência através do método de Ruby em biofilmes de <i>B. pseudomallei</i> associado a furaneol.....	102
Figura 29-	Efeito do inibidor de <i>quorum sensing</i> furaneol sobre a produção de proteases por <i>Burkholderia pseudomallei</i> na forma planctônica (A), biofilmes em formação (B) e biofilme maduro (C).....	103
Figura 30-	Efeito do inibidor de <i>quorum sensing</i> furaneol sobre a produção de sideróforos por <i>Burkholderia pseudomallei</i> na forma planctônica (A), biofilmes em formação (B) e biofilme maduro (C).....	104
Figura 31-	Efeito da homoserina lactona (8HSL) sobre a formação de biofilme (A) e sobre o biofilme maduro (B) de <i>Burkholderia pseudomallei</i>	105

Figura 32-	Análise da microscopia confocal do 8HSL associados aos biofilmes em formação e maduro de <i>B. pseudomallei</i>	106
Figura 33-	Detenção da biomassa pela fluorescência através do método de Ruby em biofilmes de <i>B. pseudomallei</i> associado a 8HSL.....	106
Figura 34-	Efeito do 8HSL sobre a produção de proteases por <i>Burkholderia pseudomallei</i> na forma planctônica (A), biofilmes em formação (B) e biofilme maduro (C).....	107
Figura 35-	Efeito do 8HSL sobre a produção de sideróforos por <i>Burkholderia pseudomallei</i> na forma planctônica (A), biofilmes em formação (B) e biofilme maduro (C).....	108

LISTA DE TABELAS

Tabela 1-	Descrição das cepas utilizadas na pesquisa.....	62
Tabela 2-	Concentrações inibitórias mínimas (CIMs) e concentrações eliminatória mínimas do biofilme (CEMBs) de antibacterianos isolados ou combinados com ramnolipídio contra crescimento planctônico e biofilmes de <i>Burkholderia pseudomallei</i> clínica e ambiental.....	79
Tabela 3-	Concentrações inibitórias mínimas (CIMs) e concentrações eliminatória mínimas do biofilme (CEMBs) de antibacterianos isolados ou combinados com CCCP contra crescimento planctônico e biofilmes de <i>Burkholderia pseudomallei</i> clínica e ambiental.....	81
Tabela 4-	Concentrações inibitórias mínimas (CIMs) e concentrações eliminatória mínimas do biofilme (CEMBs) de antibacterianos isolados ou combinados com curcumina contra crescimento planctônico e biofilmes de <i>Burkholderia pseudomallei</i> clínica e ambiental.....	83
Tabela 5-	Concentrações inibitórias mínimas (CIMs) e concentrações eliminatória mínimas do biofilme (CEMBs) de antibacterianos isolados ou combinados com furaneol contra crescimento planctônico e biofilmes de <i>Burkholderia pseudomallei</i> clínica e ambiental.....	85
Tabela 6-	Concentrações inibitórias mínimas (CIMs) e concentrações eliminatória mínimas do biofilme (CEMBs) de antibacterianos isolados ou combinados com 8HSL contra crescimento planctônico e biofilmes de <i>Burkholderia pseudomallei</i> clínica e ambiental.....	87

LISTA DE QUADROS

Quadro 1-	Descrição dos principais fatores de virulência de <i>B. pseudomallei</i>	31
Quadro 2-	Compostos utilizados como potenciais moduladores de biofilmes de <i>B. pseudomallei</i>	55
Quadro 3-	Concentrações dos antimicrobianos e dos compostos reguladores de biofilmes testados isoladamente contra <i>Burkholderia pseudomallei</i> na forma planctônica e de biofilmes.....	65
Quadro 4-	Concentrações dos antimicrobianos e compostos reguladores testados em combinação contra <i>B. pseudomallei</i> na forma planctônica e de biofilme.....	69
Quadro 5-	Concentrações dos compostos reguladores de biofilmes testados contra biofilmes em formação de <i>Burkholderia pseudomallei</i>	70
Quadro 6-	Concentrações dos compostos reguladores de biofilmes testados contra biofilmes maduros de <i>Burkholderia pseudomallei</i>	71
Quadro 7-	Concentrações dos compostos reguladores de biofilmes utilizadas para a análise estrutural de biofilmes em formação e de biofilmes maduros de <i>B. pseudomallei</i>	74

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATCC	American Type Culture Collection
AMC	Amoxiciclina-clavulanato
BHI	<i>Brain Heart Infusion</i>
CDC	Centers for Disease Control and Prevention
CEMM	Centro Especializado em Micologia Médica
CEMB	Concentração Eliminatória Mínima do Biofilme
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CLSI	Clinical Laboratory Standards Institute
CV	Cristal violeta
CCCP	Carbonil Cianeto m-clorofenil-hidrazona
CAZ	Ceftazidima
DNA	<i>Deoxyribonucleic Acid</i>
DO	Densidade óptica
EPS	Exopolissacarídeo (Extracellular Polymeric Substance)
GrAMM	Grupo Aplicado em Microbiologia Médica
LAPERRE	Laboratório de Patógenos Emergentes e Reemergentes
MER	Meropenem
MH	Mueller Hinton Broth
PBS	<i>Phosphate-buffered saline</i>
TSX	Trimetoprim/Sulfametoxazol
Ufc	Unidade formadora de colônia
8HSL	Octanoil Homoserina Lactona

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	19
2. REVISÃO DE LITERATURA	22
2.2 <i>Aspectos epidemiológicos</i>	23
2.3 <i>Agente etiológico</i>	27
2.4 <i>Transmissão de Burkholderia pseudomallei</i>	29
2.5 <i>Fisiopatologia e fatores de virulência</i>	31
2.6 <i>Manifestação clínica da melioidose</i>	33
2.7 <i>Diagnóstico laboratorial da melioidose</i>	35
2.7.2 <i>Diagnóstico molecular</i>	38
2.8 <i>Tratamento</i>	39
2.9 <i>Resistência de B. pseudomallei</i>	41
2.10 <i>Biofilmes de B. pseudomallei</i>	43
2.10.1 <i>Biofilme: um estilo de vida microbiano</i>	43
2.10.2 <i>Formação de biofilmes</i>	44
2.10.3 <i>Quorum sensing</i>	46
2.10.4 <i>Burkholderia pseudomallei associado a biofilmes</i>	47
2.10.5 <i>Compostos potencialmente utilizados para modulação de biofilmes</i>	48
2.10.6 <i>Biossurfactantes (ramnolipídio)</i>	49
2.10.7 <i>O inibidor de bomba de efluxo carbonil cianeto m-clorofenil-hidrazona</i>	50
2.10.8 <i>Inibidores de quorum sensing</i>	51
2.10.9 <i>Moléculas de quorum sensing (8HSL)</i>	54
3. HIPÓTESES CIENTÍFICAS	57
4. OBJETIVOS	59
4.1 <i>Objetivo geral</i>	59
4.2 <i>Objetivos específicos</i>	59
5. MATERIAL E MÉTODOS	61
5.1 <i>Local de estudo</i>	61
5.2 <i>Micro-organismos</i>	61
5.2.1 <i>Desenho experimental</i>	62
5.2.2 <i>Preparo de inóculo para teste de sensibilidade</i>	64

5.2.3	<i>Teste de sensibilidade às drogas antimicrobianas e aos compostos reguladores de biofilmes com B. pseudomallei na forma planctônica.....</i>	64
5.2.4	<i>Teste de sensibilidade às drogas antimicrobianas e aos compostos reguladores de biofilmes com biofilmes maduros de B. pseudomallei.....</i>	65
5.2.5	<i>Efeito dos compostos reguladores de biofilmes sobre a sensibilidade antimicrobiana de B. pseudomallei na forma planctônica e de biofilmes</i>	67
5.3	<i>Efeitos dos compostos reguladores de biofilmes sobre a formação de biofilmes por B. pseudomallei</i>	69
5.3.1	<i>Efeitos dos compostos reguladores de biofilmes sobre biofilmes maduros de B. pseudomallei.....</i>	71
5.3.2	<i>Efeito dos compostos reguladores de biofilmes sobre a produção de proteases e de sideróforos.....</i>	72
5.3.5	<i>Análise estrutural dos biofilmes de B. pseudomallei expostos aos compostos reguladores de biofilmes</i>	73
5.4	<i>Análise estatística.....</i>	75
6.	RESULTADOS	77
6.1	<i>Sensibilidade de B. pseudomallei na forma planctônica e de biofilme aos compostos reguladores de biofilmes e às drogas antimicrobianas</i>	77
6.1.2	<i>Sensibilidade de B. pseudomallei na forma planctônica e de biofilme às drogas antimicrobianas combinadas com os compostos reguladores de biofilmes.....</i>	78
6.2	<i>Ramnolipídio.....</i>	88
6.3	<i>Carbonilcianeto m-clorofenil-hidrazona (CCCP).....</i>	92
6.4	<i>Curcumina</i>	97
6.5	<i>Furaneol</i>	100
6.6	<i>Octanoil-homoserina-lactona.....</i>	105
7.	DISCUSSÃO.....	110
8.	CONCLUSÃO	122
9.	PERSPECTIVAS	122
10.	REFERÊNCIAS.....	123
11.	ANEXO A. PUBLICAÇÕES CIENTÍFICAS ORIGINADAS A PARTIR DESTE TRABALHO.....	144

Introdução

1. INTRODUÇÃO

Burkholderia pseudomallei é um patógeno bacteriano Gram-negativo, saprofítico, encontrado no solo e água de regiões tropicais e subtropicais, incluindo o norte da Austrália, Sudeste Asiático e Nordeste do Brasil (BRILHANTE et al., 2012; CURRIE et al., 2015; WIERSINGA et al., 2017). Essa bactéria é o agente causal da melioidose e acomete os homens e os animais, apresentando uma grande variedade de formas clínicas, desde infecção assintomática até choque séptico fulminante (WIERSINGA et al., 2017).

As cepas de *B. pseudomallei* são intrinsecamente resistentes a muitos antimicrobianos, principalmente às penicilinas, aos macrolídeos, aos aminoglicosídeos e às quinolonas. Nessa perspectiva, mais estudos têm demonstrado que *B. pseudomallei* vem desenvolvendo resistência aos antimicrobianos comumente utilizados no tratamento da melioidose, como amoxicilina-clavulanato, doxiciclina, ceftazidima, imipenem e sulfametoxazol-trimetoprim (RHOLL et al., 2011; SAROVICH et al., 2012; HAYDEN et al., 2012). Nesse tocante, são citados na literatura casos de resistência à ceftazidima mediada pela produção de β -lactamases (RHOLL et al., 2011; SAROVICH et al., 2012), e ao sulfametoxazol-trimetoprim, mediada pelo aumento da expressão de bombas de efluxo de amplo espectro da família resistência-nodulação-divisão celular (RND), como as bombas de AmrAB-OprA e BpeAB-OprB (CHAN et al., 2005; MIMA, SCHWEIZER, 2010; HAYDEN et al., 2012).

A formação de biofilme é um fator agravante para a resistência bacteriana (SAWASDIDOLN et al., 2010). Acerca disso, sabe-se que a capacidade de formar biofilme foi relatada para cepas de *B. pseudomallei* (ADLER et al., 2013), e acredita-se que as recidivas ou recorrências da melioidose sejam comumente causadas pela mesma cepa bacteriana, a qual não foi eliminada devido à antibioticoterapia inadequada ou, principalmente, devido à resistência *in vivo* associada à formação de biofilme (PITT et al., 2007). Além disso, diversos fatores de virulência contribuem para a patogenicidade de *B. pseudomallei*, como as proteases, que contribuem para a invasão dos tecidos hospedeiros, e os sideróforos que são responsáveis pela captação de ferro para o metabolismo bacteriano (KVITKO et al., 2012).

Portanto, considerando a dificuldade do manejo de biofilmes de *B. pseudomallei*, inúmeras pesquisas vêm sendo realizadas para buscar compreender e controlar estas estruturas bacterianas, usando diversos compostos, como biossurfactantes, inibidores de bombas de efluxo e moduladores de *quorum sensing* (GAMAGE et al., 2011; LASARRE; FEDERLE, 2013; SOLANO et al., 2014). Assim, espera-se que o uso de biossurfactantes, como o ramnolipídio, conhecido por suas propriedades emulsificantes, participem da dinâmica de formação dos biofilmes, contribuindo para a etapa de dispersão (SOLANO et al., 2014), assim como aumentando a sensibilidade de biofilmes bacterianos aos antimicrobianos (HOREV et al., 2015; NICKZAD et al., 2014; DIAZ DE RIENZO et al., 2016).

Além de biossurfactantes, já foi demonstrado que os inibidores de bomba de efluxo, como a carbonilcianeto m-clorofenil-hidrazona (CCCP), podem atuar no efluxo de homoserina lactonas, interferindo com os mecanismos de *quorum sensing* bacteriano e, conseqüentemente, com a formação de biofilme (CHAN et al., 2007a). Além disso, há relatos de que o CCCP atue contra biofilmes bacterianos, destruindo sua estrutura e, conseqüentemente, reduzindo sua biomassa.

Outras moléculas relatadas como moduladoras de biofilmes são os inibidores de *quorum sensing*, como a curcumina e o furaneol, que podem reduzir o transporte dessas moléculas sinalizadoras para o meio extracelular, interrompendo a comunicação intercelular e, conseqüentemente, a produção de biofilmes e de outros fatores de virulência, como sideróforos e proteases. Outro aspecto relevante é que, as moléculas de *quorum sensing*, como as homoserina lactonas (HSLs), são essenciais para a maturação e dispersão do biofilme maduro, podendo atuar na inibição da síntese de matriz extracelular (SOLANO et al., 2014).

Nesse contexto, vale ressaltar que várias pesquisas têm sido conduzidas com vistas à identificação de compostos que interferem diretamente no processo de formação de biofilmes, os quais podem futuramente ser utilizados como adjuvantes no tratamento da melioidose.

Revisão de literatura

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Aspectos históricos de *Burkholderia pseudomallei*

Em 1912, Whitmore e Krishnaswami isolaram um bacilo a partir de biopsias de viciados em morfina, os quais eram moradores das ruas de Rangoon, na Birmânia. Whitmore notou que o bacilo isolado era semelhante ao patógeno causador do mormo, exceto pelo fato de apresentar motilidade (WHITMORE; KRISHNASWAMI, 1912). Nesse mesmo contexto, notou-se que culturas puras desse micro-organismo produziram uma infecção fatal semelhante quando injetadas em porcos-da-índia ou adicionadas à sua alimentação (WHITMORE, 1913).

Posteriormente, Stanton e Fletcher (1921) propuseram o nome melioidose para designar a doença causada pelo patógeno. A palavra melioidose foi criada a partir da junção das palavras gregas melis e eidos, que significam “enfermidade de jumentos” alusão ao mormo, respectivamente. Diante disso, Whitmore denominou a bactéria *Bacillus pseudomallei*. Entretanto, posteriormente, o *Bacillus pseudomallei* recebeu outras classificações, tais como *Pfeifferella whitmori*, *Pfeifferella pseudomallei*, *Malleomyces pseudomallei*, *Bacillus whitmore*, *Leofflerella whitmore*, *Flavobacterium pseudomallei*, *Actinobacillus pseudomallei*. Contudo, por apresentar características fenotípicas semelhantes, esse bacilo foi incluído no gênero *Pseudomonas* (SPRAGUE; NEUBAUER, 2004). Apenas em 1992, a bactéria foi reclassificada recebendo o nome de *Burkholderia pseudomallei*, devido à diferenciação proporcionada pelo sequenciamento da região 16SRNA, pela homologia DNA-DNA e pelas diferenças presentes na composição dos lipídeos e dos ácidos graxos celulares (YABUUCHI et al., 1992).

A melioidose tem sido considerada uma das doenças infectocontagiosas causadoras de maior taxa de morbidade e mortalidade na espécie humana e entre diversas espécies de animais, incluindo primatas, camelos, cães, gatos, golfinhos, cavalos, ovinos, suínos, caprinos, aves e roedores. De acordo com Sprague e Neubauer (2004), animais de sangue frio são resistentes a *B. pseudomallei*, mas ressaltam que foram observados casos de infecção em crocodilos, cobras e peixes (CHAOWAGUL et al., 1989; LEELARASAMEE et al., 1989; CHOY et al., 2000).

A bactéria é considerada um potencial agente para guerra biológica e terrorismo biológico, apesar de não ter sido usada até o presente momento, estando

incluído na categoria B da lista de agentes críticos publicado em 2001 pelo CDC (*Centers for Disease Control and Prevention*) (SEWELL, 2003; WHITE, 2003).

2.2 Aspectos epidemiológicos

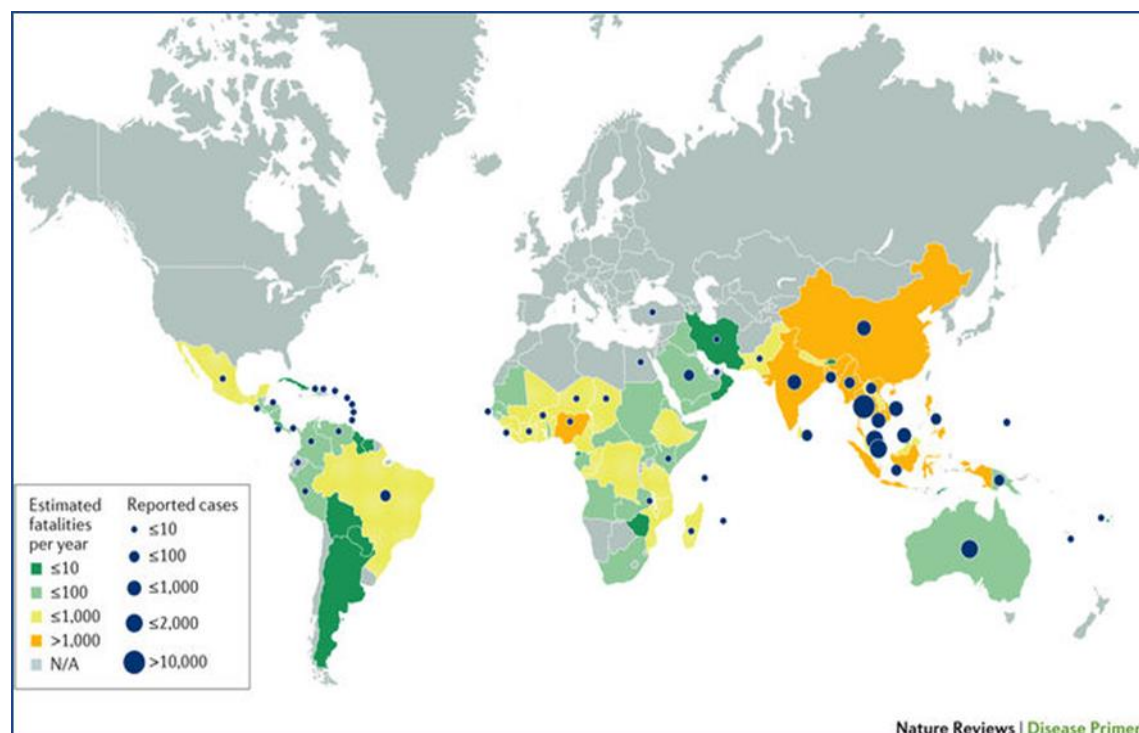
A melioidose ocorre predominantemente no sudeste asiático, norte da Austrália, China e Taiwan (DANCE, 1995; CHENG et al., 2005). Apesar de ter sido descrito pela primeira vez em 1912 na Birmânia, Malásia e Cingapura em 1913, Vietnã em 1925 e Indonésia em 1929, a melioidose não foi documentado na Tailândia até 1955 e na Austrália até 1949, apesar destes dois países terem as regiões endêmicas com altas taxas de incidência documentadas. Estima-se que 21,3 casos/100.000 habitantes ocorrem na Tailândia principalmente nas províncias do nordeste e 41,7 casos/100.000 habitantes por ano ocorre na Austrália (WIERSINGA et al., 2012; LIMMATHUROTSAKUL et al., 2016), e a maioria dos casos ocorre durante a estação chuvosa (WIERSINGA et al., 2012). No nordeste da Tailândia, a melioidose é a segunda causa mais comum de bacteremia adquirida na comunidade (WIERSINGA et al., 2012). A melioidose é agora bem reconhecida e documentada em Singapura, Malásia, Brunei, Laos, Camboja, Vietnã, China (província de Hainan e Hong Kong), Taiwan, Índia e Sri Lanka (LIMMATHUROTSAKUL et al., 2016).

Mapas da distribuição global da melioidose foram publicados e atualizados (CURRIE et al., 2008; WIERSINGA et al., 2012; LIMMATHUROTSAKUL et al., 2016; CHEWAPREECHA et al., 2017). Pequenos números de casos foram documentados nas Filipinas, Papua, Nova Guiné e nas ilhas do Oceano Pacífico e da Nova Caledônia. Além disso, casos de melioidose em humanos e animais estão sendo cada vez mais documentados em outros lugares fora das clássicas regiões endêmicas, como Oriente Médio, África, ilhas do Oceano Índico, Ilhas Maurícias, La Reunion, Madagascar, Caribe, América Central e do Sul (INGLIS et al., 2006; DOKER et al., 2014; GARIN et al., 2013; KATANGWE et al., 2013). Uma recente revisão abrangente identificou 120 casos humanos de melioidose que foram relatados nas Américas (BENOIT et al., 2015). Entre estes, 95 (79%) casos foram provavelmente adquiridos nas Américas, sendo 12 casos da América do Norte, 41 casos da América Central e do Caribe e 42 casos da América do Sul (BENOIT et al., 2015). Da mesma forma, o CDC relatou recentemente 37 casos confirmados em laboratório de

melioidose nos Estados Unidos entre 2013 e 2016 (LIMMATHUROTSAKUL et al., 2016). Entre esses, 3 casos ocorreram em residentes dos EUA sem histórico de viagens fora dos Estados Unidos (LIMMATHUROTSAKUL et al., 2016). As fontes de infecções nas Américas ainda precisam ser determinadas, mas podem estar associadas à transmissão de viajantes, animais ou materiais contaminados ambientalmente de regiões endêmicas (BENOIT et al., 2015), embora se pense que a transmissão zoonótica e de pessoa a pessoa ser raro (VERSALOVIC et al., 2011).

Apesar dos casos recentes de melioidose em vários países africanos, a verdadeira extensão e magnitude da presença de *B. pseudomallei* nas Américas, Caribe e África permanece totalmente desconhecida. Além disso, continua a ser elucidado se as recentes expansões de conhecidos locais endêmicos refletem apenas o desmascaramento da presença permanente de *B. pseudomallei* no ambiente local ou se há uma disseminação substancial ocorrendo como resultado do aumento de humanos ou animais e movimentos de plantas e solo em todo o mundo. Nesse tocante, o aquecimento global pode resultar em expansão dos limites endêmicos da melioidose (KAESTLI et al., 2009).

Figura 1. Distribuição mundial de casos de melioidoses.

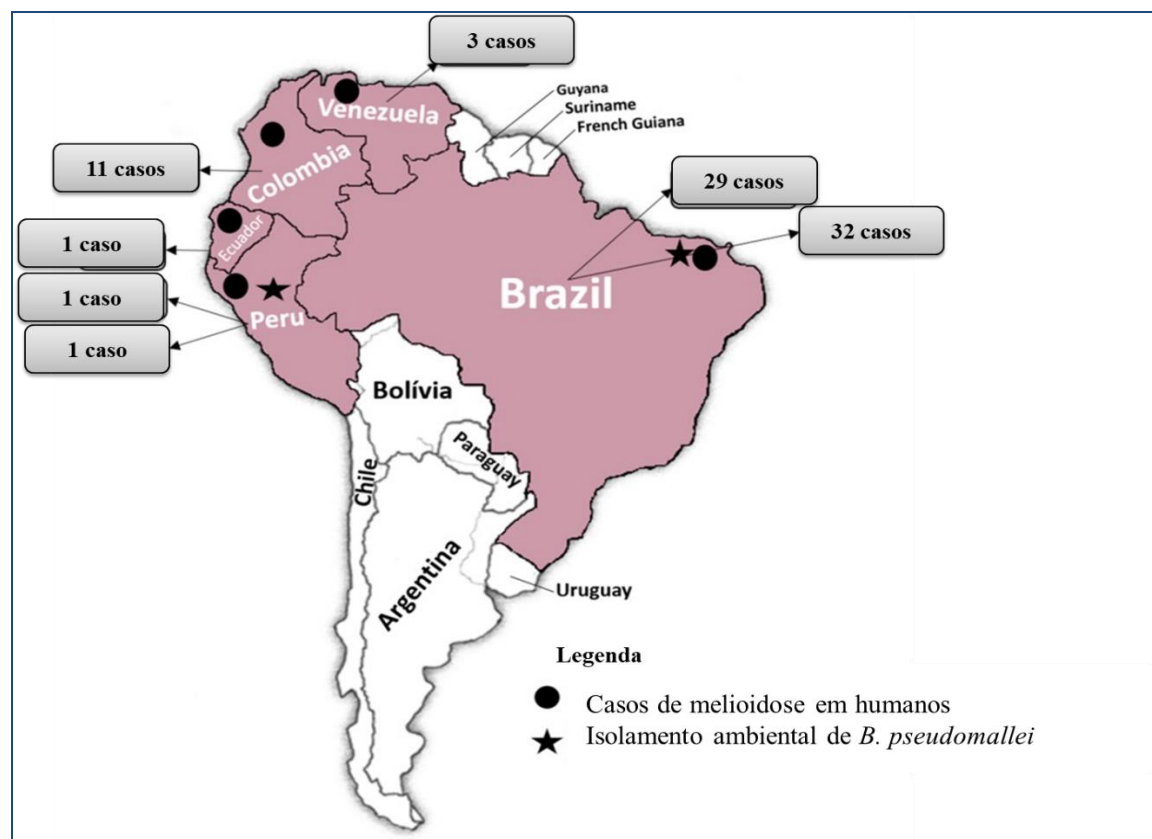


Fonte: WIERSINGA et al., 2018

Na América do Sul, o nordeste do Brasil é conhecido por ser uma área endêmica definitiva (LIMMATHUROTSAKUL et al., 2016). Inclusive, desde 2015 já é responsável por 32 dos 48 (67%) casos publicados de todo o continente (BENOIT et al., 2015). Nessa perspectiva, esse estudo amplia a perspectiva da melioidose na América do Sul, revendo casos relatados e explorando a organização de políticas públicas, tendo em vista que, apesar da relativa escassez de casos publicados, a melioidose merece, sem dúvida, ser incluída nas listas de doenças infecciosas de potencial importância epidemiológica na região.

Em 1962, no Equador, Biegeleisen relatou o primeiro caso de melioidose na América do Sul (BIEGELEISEN et al., 1962). Quinze anos depois, pesquisadores franceses relataram o isolamento de *B. pseudomallei* do solo brasileiro e peruano (GALIMAND M, DODIN A 1982; DANCE DA, 1991). Assim, desde essas descrições iniciais, apenas casos esporádicos de melioidose em humanos foram relatados em quatro países na década de 1990: Venezuela, Colômbia, Brasil e Peru (INGLIS et al., 2006; BENOIT et al., 2015) (Figura 2).

Figura 2. Distribuição de casos de melioidoses nas américas.

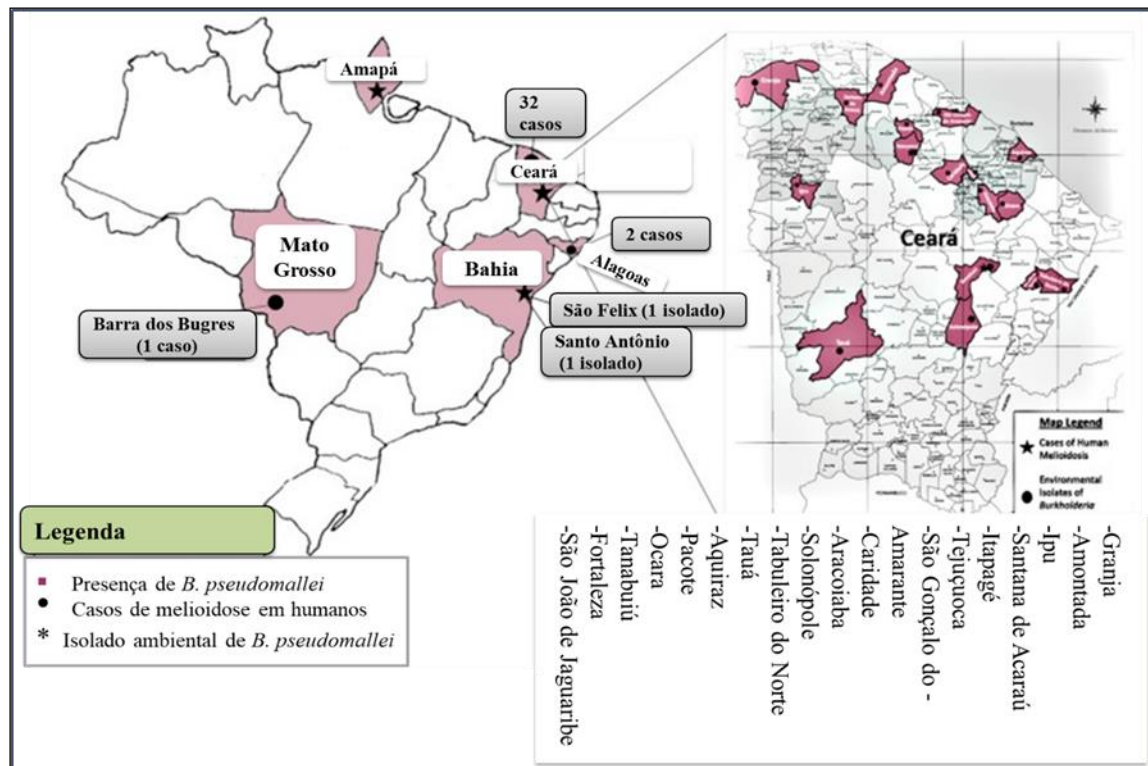


Fonte: ROLIM et al., 2018

No Brasil, os primeiros casos foram identificados em março de 2003, no município de Tejoçuoca, estado do Ceará, quando um surto ocorreu com quatro crianças irmãs. Esse surto apresentou alta letalidade e três crianças evoluíram para óbito em consequência de sepse e pneumonia grave, num intervalo de apenas sete dias. A investigação epidemiológica identificou o fato de que a provável infecção ocorreu por exposição à água durante o banho numa barragem. Desde então, novos casos da doença vêm sendo detectados no Ceará, onde, até 2018 32 casos foram confirmados em diferentes municípios (ROLIM et al., 2009; BRILHANTE et al., 2012; BANDEIRA et al., 2013a; CASTELO-BRANCO et a., 2016; ROLIM et al.,2018) (Figura 3). Além do Ceará, há registro isolado da doença nos Estados de Mato Grosso e Alagoas.

Mesmo assim, a melioidose ainda é desconhecida no país e no estado Ceará há pouca suspeição diagnóstica, fazendo com que a doença seja subnotificada (ROLIM et al., 2009; BANDEIRA et al., 2013^a, SESA, 2017). Diante de seu comportamento endêmico e de sua importância como um problema de saúde pública emergente, a Secretaria de Saúde do Estado do Ceará (SESA) alerta continuamente os profissionais de área para a sua vigilância contínua e detecção precoce de casos, o que pode garantir maiores níveis de evolução para a cura. Essa doença é de notificação compulsória estadual (Portaria estadual nº 1.786/ 2005).

Figura 3. Distribuição de casos de melioidoses no Brasil



Fonte: ROLIM et al., 2018

2.3 Agente etiológico

O genoma de *B. pseudomallei* foi determinado a partir da cepa K96243 isolada de um caso clínico na Tailândia. E contém 7.25 megabases de pares de base e consiste em dois replicons circulares. O cromossomo 1 (4,07 Mb) e o cromossomo 2 (3,17 Mb). O cromossomo 1 codifica amplamente as proteínas envolvidas nas funções básicas de manutenção, como a síntese, o metabolismo e a motilidade da parede celular, enquanto o cromossomo 2 codifica principalmente proteínas necessárias para funções acessórias envolvidas na adaptação às condições ambientais (GALYOV et al., 2010).

B. pseudomallei está classificado taxonomicamente em:

Reino- Bacteria,

Filo- Beta Proteobacteria,

Ordem - Burkholderiales,

Família - *Burkholderiaceae*,

Gênero – *Burkholderia*

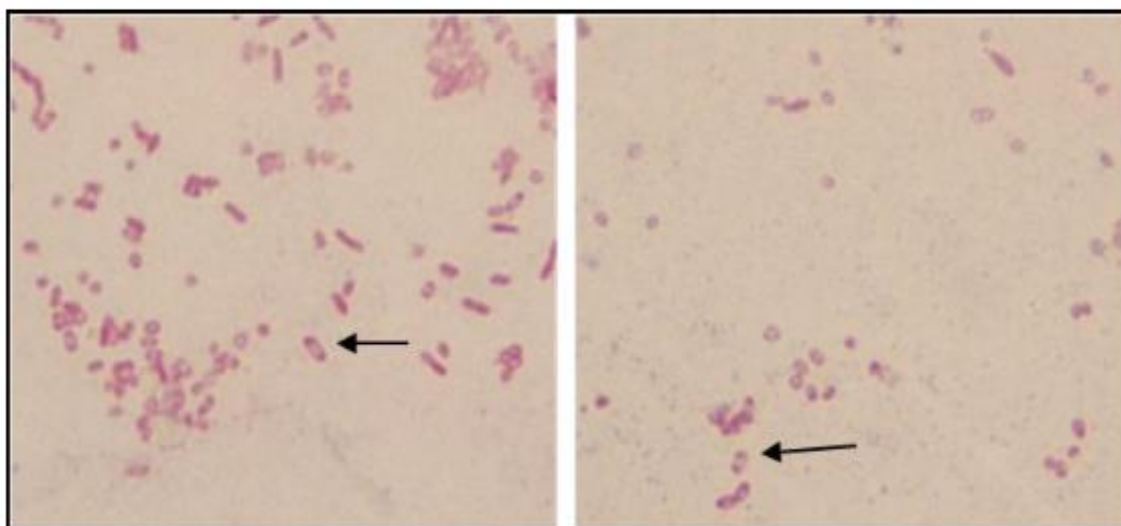
Espécie - *Burkholderia pseudomallei*.

(BRENNER; KRIEG; STALEY,

2005).

B. pseudomallei é um bacilo Gram-negativo, intracelular facultativa, oxidase positiva pelo teste citocromo, ligeiramente curvo e mede aproximadamente 0,5 a 1,0 μ , não esporulado e apresenta estrutura bipolar vacuolizado delgado pela coloração de Gram. Essas estruturas muitas vezes se assemelham a “alfinete de segurança” (Fig.1). *B. pseudomallei* possui também cápsula polissacarídica, que constitui um importante fator de virulência para a patogênese da doença (RECKSEIDLER-ZENTENO; DE VINNEY; WOODS, 2005).

Figura 4. Esfregaço de colônia corado pelo Gram (100X).



Fonte: LAPERE, 2015. Legenda: A seta indica o bacilo Gram-negativo bipolar, vacuolizado em forma de “alfinete de segurança”.

B. pseudomallei apresenta diferentes características morfológicas nos meios de culturas. As colônias podem apresentar aparências lisas e ressecadas ou amassadas, geralmente após 48 horas, dependendo do meio de cultura (KOH; TAY; PUTHUCHEARY, 2013).

O gênero *Burkholderia* faz parte de grupo dos bacilos Gram-negativo não fermentador de glicose e são aeróbios, ou seja, depende de oxigênio comoceptor final de elétrons (HAMAD et al., 2011). A designação de “não fermentador” significa que essa espécie de bactéria não metaboliza glicose pela via da fermentação de Embden-Meyerhof-Parnas (EMP), também denominada via glicolítica ou anaeróbica (HUGH; LEIFSON, 1953). A espécie *B. pseudomallei* possui, entretanto, a capacidade de utilizar o nitrato ou nitrito no lugar do oxigênio comoceptor final de elétrons (KONEMAN et al., 2008). A incapacidade de assimilar L-arabinose (ara-), apresentada pela *B. pseudomallei*, está correlacionada com o grau de virulência desta espécie e esta característica é a base da diferenciação da outra espécie do gênero, *B. thailandensis* (ara +) (SMITH et al., 1997).

2.4 Transmissão de *Burkholderia pseudomallei*

A transmissão de *B. pseudomallei* é geralmente ambiental (CHEN et al., 2010; CHEN et al., 2015; AMADASI et al., 2015; HSUEH et al., 2018; DONG et al., 2018). O bacilo pode sobreviver por meses ou anos em solo ou água contaminados, incluindo solos ácidos, solos desidratados e solos com teor de sal de 0,4%. É conveniente destacar que não sobrevive a luz UV (MEUMANN et al., 2012).

A infecção pode ocorrer devido a inoculação percutânea, através de uma penetração por injúria ou lesão já existente; inalação ou ingestão a partir de água ou alimento contaminado (Figura 5). Destaca-se que, como a melioidose é uma doença essencialmente sazonal, 75 a 81% dos casos ocorrem durante o período chuvoso (MEUMANN et al., 2012; WIERSINGA; CURRIE; PEACOCK, 2012; CHEN et al., 2015). De modo geral, com base em evidências, a inoculação percutânea é provavelmente a via mais frequente de infecção natural, uma vez que a maioria das pessoas que adquirem melioidose são trabalhadores agrícolas, que tem contato direto e contínuo com o solo (LIPSITZ et al., 2012; DONG et al., 2018).

Vários fatores de riscos podem predispor a melioidose, incluindo diabetes melitus presentes em mais de 50% dos pacientes com melioidose em todo mundo (CURRIE et al., 2004; LIMMATHUROTSAKUL et al., 2010). Indivíduos com diabetes melitus apresentam um risco 12 vezes maior de desenvolver a melioidose (CURRIE et al., 2004; LIMMATHUROTSAKUL et al., 2010). Outros fatores de riscos incluem exposição ao solo e água (especialmente durante a estação chuvosa), sexo masculino (provavelmente devido a um risco maior de exposição ambiental), idade >45 anos, excesso de consumo de álcool, doenças hepáticas, doenças pulmonares, doenças renais e talassemia (que provavelmente causa disfunção dos neutrófilos devido à sobrecarga do ferro no organismo) (CHENG et al., 2005; FONG et al. 2015). Ademais, o uso prolongado de esteroides e a imunossupressão também podem predispor os indivíduos a infecção. No entanto, mais de 80% dos pacientes pediátricos (MCLEOD et al., 2015; TURNER et al., 2016) e aproximadamente 20% dos pacientes adultos não apresentam fatores de risco reconhecido (CURRIE et al., 2004; LIMMATHUROTSAKUL et al., 2010).

Melioidose em adultos que não apresentam fatores de risco, geralmente ocorre naqueles que foram expostos a uma alta carga bacteriana, por exemplos, por aspiração de água superficial (LIM et al., 1997). A transmissão zoonótica para humanos resultantes do contato com o gado é extremamente rara; apenas três casos possíveis foram relatados na Austrália (CHENG et al., 2005).

Figura 5. Diferentes formas de transmissão de *Burkholderia pseudomallei*



Fonte: WIERSINGA et al., 2014

2.5 Fisiopatologia e fatores de virulência

B. pseudomallei possui diferentes tipos de sistemas de secreção essenciais para a sua disseminação e sobrevivência intracelular (OOI et al., 2013). Vários fatores de virulência desempenham papel importante na infecção por *B. pseudomallei* tais como: polissacarídeo capsular (LPS), adesinas, motilidade baseada na polimerização da actina e sistemas de secreção especializados (Tipos III / IV e VI). Esses sistemas de secreções funcionam como uma seringa molecular. Um subconjunto de proteínas secretadas pelo sistema tipo III (translocadores) interage com a membrana da célula eucariótica e inoculam outras proteínas efetoras no citosol da célula alvo. Após a internalização, *B. pseudomallei* escapa dos vacúolos endocíticos para o citoplasma das células infectadas através da polimerização de actina e desencadeia a formação de protuberâncias de membrana e disseminação de célula a célula (WIERSINGA, et al., 2006; LAZAR ADLER et al., 2009; ALLWOOD et al., 2011; PEDRA et al., 2014; WILLCOCKS et a., 2016).

Quadro 1. Descrição dos principais fatores de virulência DE *B. pseudomallei*.

Gene	Antígeno	Função	Referência
Aderência			
PilA	Proteína pelina tipo IV	- Adesão dependente da temperatura e formação de microcolonias de <i>B. pseudomallei</i> . - Motilidade intracelular.	Allwood et al., 2011
boaA	Adesina	Autotransportador de TSS5	Campos et al., 2013
boaB	Adesina	- Responsável pela ligação celular e possivelmente na replicação intracelular.	Lafontaine et al., 2014
bpaC	Adesina	- Protege contra a bactéria da destruição do sistema complemento. - Envolvida na ligação das células epiteliais da mucosa.	Stone et al., 2014
fliC	Componente estrutural de flagelina	- Envolvida na aderência celular - Permite a motilidade	Chau et al., 2003
Invasão			
bopE	Troca de nucleotídeos de guanina Fator BopE	- Efeito T3SS - Induz rearranjos de actina e auxilia na invasão celular	Stevens et al., 2003
bipB	Proteína transportadora	- Componentes T3SS - Envolvido na sobrevivência das vesículas endocíticas, fuga e invasão celular.	Allwood et al., 2011 Stevens et al., 2004
bipC	Proteína efetora		
bipD	Proteína transportadora		
Escape endocítico			
		- Componente do T3SS	

bopA	Proteína efetora	- Envolvido na ruptura da membrana da vesícula endocítica e evitar a autofagia.	Gong et al., 2011
bsaQ	Componente estrutural do T3SS	- Envolvido no escape de vesículas endocíticas, invasão celular e formação de placa na membrana	Sun et al., 2010
bsaZ	Componente estrutural do T3SS	- Envolvido no escape de vesículas endocíticas e na replicação intracelular	Burtnick et al., 2008
bsaU	Componente estrutural do T3SS	Envolvido no escape de vesículas endocíticas e ativação precoce da caspase 1 em macrófagos	Bast et al., 2014
Sobrevivência intracelular			
purM	Fosforibose	- Via biossintética da purina	Allwood et al., 2011
purN	Fosforibose, glicina transferase	- Comunicação intracelular por mecanismos de comunicação	Pilatz et al., 2006
sodC	Superóxido dismutase	- Resistência ao estresse oxidativo	Myers et al., 2014
katG	Catalase-peroxidase		Vanaporn et al., 2011
ahpC	Redutor de hidroperóxido de alquila		
dpsA	Proteína de proteção da fase estacionaria	- Resistência ao estresse oxidativo	Myers et al., 2014
virAG locus	Sistema regulador de dois componentes	- Regula a transcrição de T6SS - Sequestra o ferro das vesículas endocíticas. - Regulando positivamente o pH ácido, facilitando o processo de secreção de T6SS.	Willcocks et al., 2016
Motilidade baseada em actina			
bimA	Autotransportador T5SS	Foge do vácuo endocítica pela formação da fagossoma e actina	Sarovich et al., 2014
Formação de células gigantes multinucleares			
hcp1	Efeito de T6SS da família Hcp1	- Papel na fusão celular e citotoxicidade macrofágica. - Induz a produção de IL-10 e TGF β	Leiman et al., 2009
vgrG5	Elemento da proteína Vgr	- Proteína efetora do T6SS - Funcionalmente conservado em <i>Burkholderia spp.</i>	Toesca et al., 2014

Fonte: WIERSINGA et al., 2018

A entrada na célula é auxiliada por flagelos, lipopolissacarídeos (LPS), pili tipo IV e adesinas BoaA e BoaB. Em seguida, escapa rapidamente da vesícula endocítica, lisando a membrana usando T2SS, T3SS e T6SS. A flexibilidade metabólica com relação a resistência ao estresse oxidativo, resistência a peptídeos catiônicos antimicrobianos e a produção de actina permitem que as bactérias sobrevivam dentro de um ambiente endocítico ácido.

A proteína efetora BopA e a proteína translocadora BipD, por sua vez, bloqueiam ainda mais o sequestro em vesículas endocíticas e previnem a proteína associada a microtubulos 1A/1B da autofagia associada a cadeia leve 3B (LC3). Dessa forma, uma vez livre no citoplasma, *B. pseudomallei* replica, induz a formação de protrusões de membrana à base de actina e pode se mover através de polimerização contínua da actina da célula hospedeira nas extremidades polares (um processo regulado pelo autotransportador BimA), facilitando, assim, a disseminação para células vizinhas, fusão celular e formação de células gigantes multinucleares (MNGC). O T6SS e o sistema de secreção do tipo IV (VgrG-5) são essenciais para este processo.

Nota-se assim, a capacidade que *B. pseudomallei* tem de secretar uma infinidade de proteínas com inúmeras atividades diferentes, dentre elas, proteases e fosfolipases (STONE et al., 2014). Há também a produção de toxinas, sendo o principal fator letal (BPLS1549), que se assemelha ao fator necrosante citotóxico da *Escherichia coli*. Esse fator interfere com a iniciação da tradução, levando a uma alteração do citoesqueleto de actina da membrana da célula hospedeira e, finalmente, à morte celular (CRUZ-MIGONI et al., 2011). Outro fator de virulência relevante para a patogênese de *B. pseudomallei* é a formação de biofilme. Esse tipo de conformação confere maior proteção às bactérias que o compõe, tornando-as mais resilientes às adversidades do meio que as cerca (SAWASDIDOLN et al., 2010).

2.6 Manifestação clínica da melioidose

A infecção por *B. pseudomallei* geralmente se manifesta de forma subclínica e difícil de diagnosticar (ZUETER et al., 2016). O aspecto clínico da doença varia de infecção cutânea localizada no local da inoculação, sem manifestações sistêmicas até sepsis e óbito. Os aspectos clínicos da melioidose e a sua gravidade estão correlacionados com a carga bacteriana do inóculo, via de infecção, virulência da

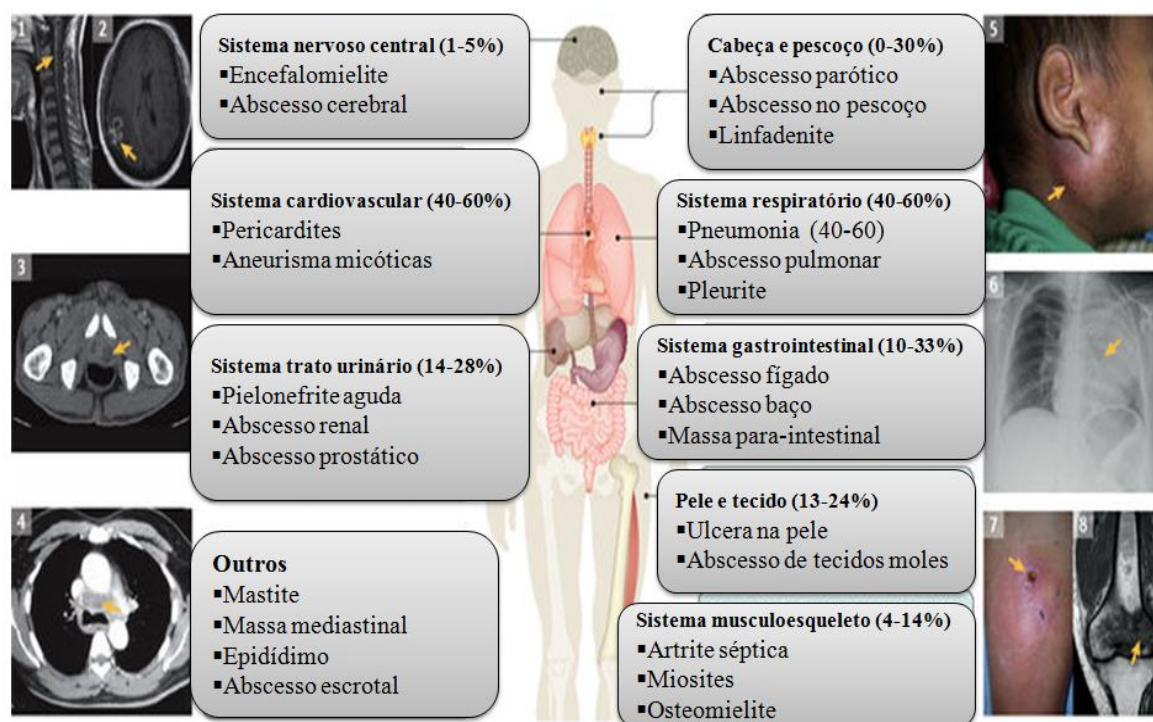
cepa infectante e fatores de risco, incluindo alcoolismo (12-39%), doença pulmonar crônica (10-27%), comprometimento renal (10-27%), uso de glicocorticoides ou terapia imunossupressora (<5%) e câncer (<5%) (CURRIE et al., 2015). A doença também já foi descrita em pacientes com lúpus eritematoso sistêmico, poliartrite nodosa, doença granulomatosa crônica, além de fibrose cística (CURRIE et al., 2010).

A pneumonia é a forma de manifestação clínica mais comum da melioidose e pode ocorrer em metade de todos os casos. A melioidose, por apresentar amplo espectro de apresentação clínica, não possui nenhuma classificação completamente satisfatória. Nesse sentido, a infecção pode ser aguda ou crônica e localizada ou disseminada para os outros órgãos (KINGSLEY et al., 2016; FU et al., 2016; ZHAN et al., 2017). O acometimento pulmonar pode se apresentar desde um quadro indiferenciado de pneumonia com febre alta, cefaleia, mialgia generalizada, dor torácica associada ou não à tosse seca, até pneumonia necrotizante fulminante e choque séptico. A presença de derrame pleural não é comum, embora efusão e empiema possam ocorrer, especialmente quando há comprometimento de lobos pulmonares inferiores. Efetivamente, uma vez instalado o choque séptico, a letalidade é bastante elevada e os pacientes podem evoluir para óbito dentro de 48 horas após a hospitalização (FU et al., 2016; ZHAN et al., 2017).

Além da pneumonia, a melioidose possui diversas formas clínicas, tais como endoftalmite, aneurisma micótico de aorta, abscesso escrotal, prostatite e acometimento musculoesquelético como mostra a Figura (6) (KINGSLEY et al., 2016; ZUETER et al., 2016; FU et al., 2016).

O período de incubação varia de 1 a 21 dias (média de 9 dias) para apresentações agudas que representam 85% de todos os casos de melioidose. A melioidose crônica se dá quando os sintomas da doença estão presentes por mais de 2 meses. Comumente, os pacientes apresentam doença crônica respiratória, mimetizando a tuberculose, dispondo de sinais como febre, perda de peso e tosse produtiva com presença ou não de hemoptise. Com a permanência da doença, há a sua disseminação, geralmente na forma de abscessos envolvendo diversos sítios (FOONG et al., 2014).

Figura 6. Manifestações clínicas da melioidose



Fonte: ROTHE et al., 2014; WIERSINGA et al. 2018

Ressonância magnética do tronco encefálico e medula espinhal cervical com alterações inflamatórias compatíveis com encefalomielite (**seta-1**); uma lesão com edema circundante na imagem de ressonância magnética indicando abscessos cerebrais (**seta-2**); uma imagem de TC de abscessos prostáticos (**seta-3**); imagem de TC de massa mediastinal (**seta-4**); uma criança com parotidite tensa (**seta-5**); Imagem de radiografia de pneumonia grave (**seta-6**); foto de um abscesso subcutâneo (**seta-7**); e uma imagem de ressonância magnética de osteomielite do fêmur distal com inflamação ao redor (**seta-8**).

2.7 Diagnóstico laboratorial da melioidose

2.7.1 Diagnóstico microbiológico

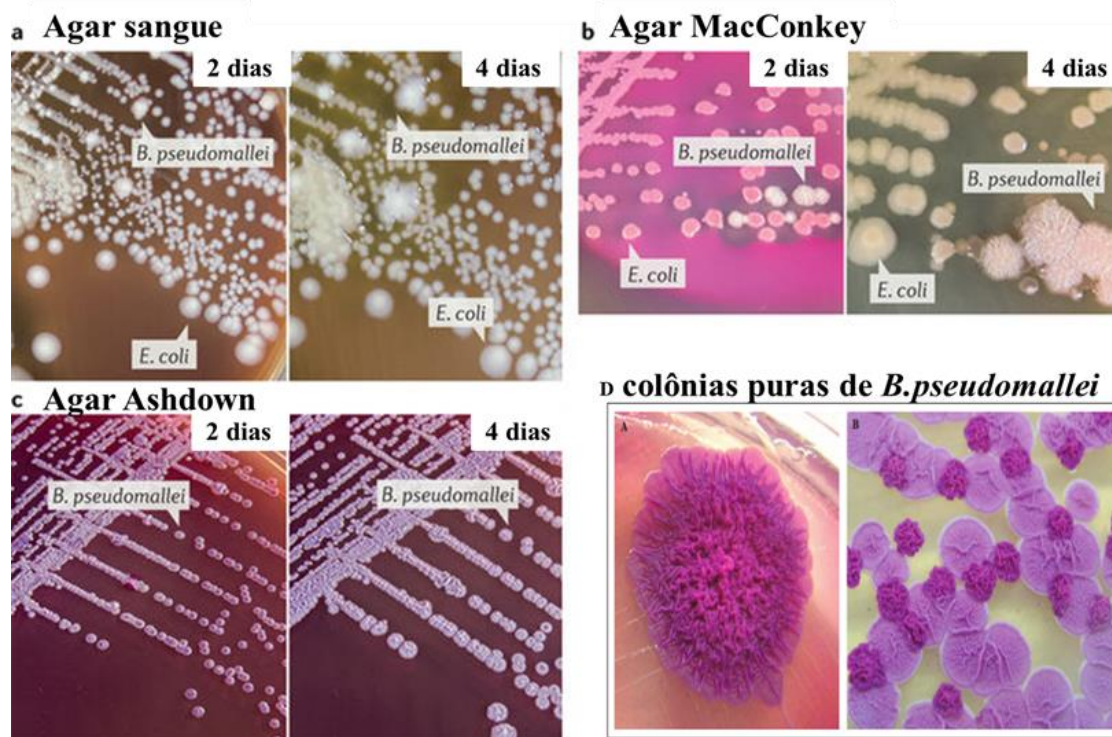
O isolamento de *B. pseudomallei* pode ser feito a partir de amostra provenientes de diferentes sítios anatômicos (INGLIS et al., 2006). Essa bactéria, por não ser fastidiosa, cresce facilmente em meios de cultura convencionais (LIMMATHUROTSAKUL et al., 2010). O centro de controle de doenças infecciosas (CDC), recomenda que a hemocultura, amostra de urina centrifugada e *swab* de garganta devam ser obtidas e cultivadas em meios seletivos em todos os pacientes

com suspeita de melioidose, independentemente de seus sintomas (PAVÃO et al. 2005; BENOIT et al., 2015).

Amostras de escarro, esfregaço de lesões superficiais e aspirados de pus devem ser coletados de pacientes com pneumonia e cultivados também em meios seletivos. A cultura de amostras de *swab* retal em caldo seletivo também pode ser útil (THORM et al., 2014). Em casos de suspeita da melioidose, os médicos devem notificar os laboratórios para que possam realizar testes apropriados e usar práticas de biossegurança apropriadas para evitar a exposição laboratorial (CDC, 2004; PAVÃO et al., 2008). Nesse sentido, como muitas amostras de pacientes com suspeita de melioidose, são coletadas em local não estéril, o uso de meios seletivos é fundamental.

O Agar Ashdown é um meio seletivo e comumente usados em países onde a melioidose é endêmica (ROESNITA et al., 2012). Esse meio é composto de, entre outros componentes, Agar-tripticase soja, glicerol, cristal violeta 0,1% e vermelho neutro 1% havendo também a adição de gentamicina ou polimixina B (ASHDOWN, 1979; WUTHIEKANUN; DANCE, 2012), mas não está disponível comercialmente na maioria dos países. As colônias de *B. pseudomallei* são geralmente cremosas ou podendo ter uma aparência enrugada após incubação por >24 horas em Agar sangue, embora seja observada variação considerável (Figura 7). No Agar MacConkey, as colônias de *B. pseudomallei* são pálidas (não fermentadoras de lactose) e podem tornar-se rosa ou rugosa após 48 horas. Em Agar TSI, *B. pseudomallei* pode indicar ausência de alteração ou ligeira oxidação. No entanto, a aparência morfológica de colônias bacterianas em meios de cultura comuns também pode ser diferente. A demonstração de colônias típicas em Agar Ashdown após incubação prolongada (48-96 horas) e o aparecimento de uma película no caldo Ashdown aumenta a suspeita de contaminação por *B. pseudomallei* (LIMMATHUROTSAKUL et al., 2010; BENOIT et al., 2015). Na ausência desses meios especializados, um disco de colistina ou de polimixina B também pode ser colocado nos primeiros quadrantes de placas de Agar sangue para auxiliar na seleção de *Burkholderia* spp, pois são inerentemente resistentes às polimixinas (VERSALOVIC et al., 2011; BENOIT et al., 2015).

Figura 7. Identificação de colônias de *B. pseudomallei* em três tipos comuns de Agar



Fonte: WIERSINGA et al., 2018

A- *B. pseudomallei* forma colônias cremosas e não hemolíticas que se assemelham a um coliforme após 2 dias de incubação; no 4 dia, as colônias são cobertas por um leve brilho metálico e se tornam secas e enrugadas; **B-** As colônias de *B. pseudomallei* assemelham-se a um coliforme de fermentação não-lactose incolor após 2 dias de incubação; no 4 dia, as colônias parecem secas e enrugadas; **C-** Após 2 dias de incubação, as colônias *B. pseudomallei* são pontuais com uma cor clara a rosa pálida; no 4 dia, tornam-se rosa escuro a roxo, plano, ligeiramente seco e enrugado com um brilho metálico definido. *E. coli* não cresce porque é inibida pela gentamicina no Agar; **D-** Colônias puras de *B. pseudomallei* com brilho metálico e enrugado.

No que se refere as suas características bioquímicas, *B. pseudomallei* apresenta citocromo oxidase positiva, faz parte do grupo de bactérias não fermentadoras e é capaz de oxidar a glicose, maltose, lactose, manitol, arginina e lisina. Essas características nutricionais também podem ser avaliadas através do uso do sistema API 20E ou API 20NE, que consiste em uma tira plástica composta por 20 compartimentos que contém substratos desidratados. A ação da bactéria sobre o substrato produz turvação ou mudança de cor que são interpretadas visualmente. A presença de motilidade é um fator significativo para a diferenciação dessa espécie, uma vez que a *B. mallei* é uma bactéria imóvel (KONEMAN et al., 2008).

As características bioquímicas também podem ser utilizadas pelo sistema automatizado Vitek 2® bioMérieux para a identificação da bactéria. Cientes dos erros de identificação de *B. pseudomallei* como *B. cepacia* cometidos pelo Vitek 2® bioMérieux, Podin et al. (2013) testaram a identificação de 68 cepas clínicas de *B. pseudomallei* provenientes de hospitais da Malásia e de 149 cepas de *B. pseudomallei* isoladas no Darwin Hospital Real, na Austrália. Observou-se que 35% das cepas da Malásia foram erroneamente identificadas como *B. cepacia*, enquanto apenas 2% das cepas australianas foram confundidas com esta espécie. Notou-se assim que os erros de identificação cometidos pelo Vitek 2® bioMérieux estão intimamente relacionados com as características moleculares das cepas de cada região.

Podemos presumir assim, que os médicos e cientistas precisam estar cientes do potencial erro de identificação de *B. pseudomallei* como *B. cepacia* pelo sistema de identificação bioquímica automatizado Vitek 2 ® bioMérieux. Além disso, dificuldades semelhantes são suscetíveis de serem encontradas com outros sistemas de identificação automática, como MALDI-TOF MS, pois esses sistemas são desenvolvidos para serem utilizado em pacientes infectados em diversas localizações geográficas. Para retificar essas identificações, pode-se utilizar a técnica de PCR usando alvos validados e, adicionalmente, o sequenciamento também poderá ser realizado. Como alternativa para os laboratórios com recursos limitados, uma combinação de aglutinação em látex e teste de sensibilidade à amoxicilina/clavulanato ajuda a distinguir *B. pseudomallei* de *B. cepacia*, sendo esta última resistente a essa combinação de drogas (PODIN et al., 2013).

2.7.2 Diagnóstico molecular

Os métodos moleculares para a detecção e diferenciação das espécies de *Burkholderia* tem sido um tema recente na pesquisa. Embora sendo um método sensível, mas não usado rotineiramente em regiões endêmicas para a melioidose (KAESTLI et al., 2012; LAU et al., 2014; GÖHLER et al., 2017, BANDEIRA et al., 2017). Diversas técnicas de PCR foram desenvolvidas e avaliadas, incluindo PCR convencional e PCR em tempo real, rápidos e sensíveis. Alguns ensaios detectam exclusivamente *B. pseudomallei*, enquanto outros são projetados em formatos multiplex PCR para identificar *B. pseudomallei* e diferenciá-lo de outros

Burkholderia, como *Burkholderia mallei* ou *Burkholderia thailandensis* (LAU et al., 2014; GÖHLER et al., 2017; SUBAKIR et al., 2019). Comumente, os testes moleculares utilizam *primers* alvejando as regiões 23S rRNA, 16S rRNA, 16S mRNA e 23S mRNA. A detecção da região 16S rRNA tem resultados relevantes, por apresentar alta sensibilidade. Adicionalmente, a sequência 16S mRNA é usada há tempo para a identificação de espécies de bactérias, bem como para o reconhecimento do gênero *Burkholderia* spp (LAU et al., 2014; GÖHLER et al., 2017; BANDEIRA et al., 2017).

Alternativamente, utilizando-se PCR, pode-se identificar os genes referentes a regiões específicas do sistema de secreção tipo III (TTS-3), a partir de culturas de *B. pseudomallei* ou de amostras de hemocultura positivas (NOVAK et al., 2006). Também estão sendo desenvolvidos métodos rápidos de teste de sensibilidade aos antimicrobianos que usam PCR quantitativo para avaliar rapidamente a suscetibilidade, comparando o crescimento de bactérias expostas a concentrações variáveis de drogas antimicrobianas com aquelas de bactérias não expostas (GÖHLER et al., 2017; SUBAKIR et al., 2019).

2.8 Tratamento

B. pseudomallei não é sensível a alguns medicamentos que são frequentemente utilizados empiricamente para tratar infecções. Combinações de drogas foram geralmente utilizados para o tratamento no passado, mas alguns novos antibióticos simples são igualmente eficazes. Atualmente, o protocolo recomendado divide a terapêutica em duas fases: a primeira é a fase intensiva, que visa impedir a morte do paciente por sepse, e a segunda fase é a de erradicação, cujo objetivo é erradicar qualquer bactéria residual, minimizando assim o risco de infecção recorrente (DANCE, 2014). Inicialmente, os pacientes recebem antibióticos intravenosos por um mínimo de 10 a 14 dias (mais tempo em algumas condições). Isto é seguido por um tratamento prolongado com antibióticos, geralmente com drogas orais, durante vários meses ou mais. O objetivo da segunda etapa é eliminar o agente do corpo. O tratamento oral prolongado, por si só, foi relatado como sendo eficaz em algumas condições mais leves em pessoas saudáveis. Alguns pacientes também necessitam de

tratamentos adjuntos, como terapia de suporte para choque séptico. Ressecção pulmonar ou drenagem de abscessos são ocasionalmente necessários.

Ao mesmo tempo, até 30% dos pacientes recidivaram após serem tratados por melioidose. No entanto, as recidivas são muito menos comuns com novos regimes de tratamento e tendem a ocorrer principalmente nos casos em que o uso dos antibióticos não está concluído.

Atualmente, ceftazidima ou imipenem são usados na fase intensiva da melioidose. O tratamento tem duração mínima de 10 – 14 dias, sendo prolongado em casos críticos da doença, incluindo pneumonia grave, abscessos profundos acometendo múltiplos órgãos, osteomielite, artrite séptica e melioidose neurológica (CURRIE, 2015).

Apesar dos carbapenêmicos se mostrarem mais ativos contra *B. pseudomallei* nos testes in vitro, até o presente momento, não há evidências de que algum agente seja mais eficaz do que ceftazidima para a reduzir a mortalidade durante a fase intensiva do tratamento da melioidose. Assim, os carbapenêmicos continuam reservados para casos de sepse severa, infecção do sistema nervoso central ou casos refratários após tratamento com ceftazidima (CHENG et al., 2005; DANCE, 2014).

Em relação à utilização de outros antibióticos, a adição da combinação sulfametoxazol/trimetoprim torna-se vantajosa em casos neurológicos, cutâneos, ósseos, articulares e melioidose prostática. Esse melhoramento na terapêutica ocorre devido à boa penetração da sulfametoxazol/trimetoprim nos tecidos. Apesar disso, estudos randomizados demonstram que a vantagem da adição dessa combinação se restringe apenas a esses tipos de casos (CURRIE, 2015).

Posteriormente à terapia intensiva, inicia-se a segunda fase do tratamento, que visa prevenir a recrudescência da doença. O agente de escolha inicial para esta fase é a combinação sulfametoxazol/trimetoprim. Esta combinação de drogas é utilizada há muitos anos no nordeste da Austrália, área endêmica da doença, com excelentes resultados (CURRIE et al., 2000). Ademais, estudos indicam que a adição de doxiciclina não oferece mudanças significativas se comparado ao uso isolado de sulfametoxazol/trimetoprim (CHUSRI et al., 2012).

Além desses antimicrobianos, amoxicilina/clavulanato tem sido usado como medicação alternativa para crianças e para mulheres grávidas. Esta combinação de drogas, bem como a doxiciclina, são substituições plausíveis para sulfametoxazol/trimetoprim em casos de efeitos adversos, tais como rash cutâneo, sintomas gastrintestinais, hipercalemia e alterações nos níveis de creatinina, sintomas comumente visualizados (CURRIE, 2015).

Existem muitas tentativas de padronizar as diretrizes para o tratamento da melioidose. A busca na literatura, acerca da eficácia do tratamento, mostra que os maiores dilemas na terapêutica incluem a sua duração, a pertinência da terapia com drogas combinadas, a necessidade de prolongar o tratamento da fase de erradicação e a adoção de outras modalidades terapêuticas (CURRIE, 2015).

A recomendação padrão é o uso injetável da cefalosporina ceftazidima ou de um carbapenêmico para o tratamento inicial da fase intensiva, com duração de 2-4 semanas; e a combinação sulfametoxazol/trimetoprim e doxiciclina para a fase de erradicação, abrangendo um período de 12-20 semanas. As recomendações pioneiramente formuladas a partir das observações feitas nos casos australianos foram adaptadas para os demais ambientes emergentes e reemergentes da doença, incluindo América do Sul e Central. Assim, devido à grande variedade de manifestações clínicas da melioidose, torna-se necessário um julgamento crítico acerca das necessidades individuais de cada paciente (INGLIS, 2010).

2.9 Resistência de *B. pseudomallei*

As cepas de *B. pseudomallei* são intrinsecamente resistentes a muitas classes de antibióticos, principalmente às penicilinas, aos macrolídeos, aos aminoglicosídeos e às quinolonas. Estudos *in vitro* demonstram que *B. pseudomallei* vem desenvolvendo resistência aos antimicrobianos comumente utilizados no tratamento da melioidose, como amoxicilina-clavulanato, doxiciclina, ceftazidima, imipenem e sulfametoxazol-trimetoprim (RHOLL et al., 2011; SAROVICH et al., 2012; HAYDEN et al., 2012).

Para tanto, essa bactéria possui diversos mecanismos de resistência, incluindo a supressão do contato com a droga, inativação enzimática, alterações cromossômicas e formação de biofilme (ADLER et al., 2013; SCHWEIZER, 2012).

Uma das formas de autopreservação é a supressão do contato da bactéria com a droga. Essa característica excludente é apresentada por diversas bactérias Gram-negativas, uma vez que as propriedades físico-químicas da composição das porinas e dos lipopolissacarídeos (LPS) influenciam nessa exclusão (RAETZ et al., 2007). Essa incompatibilidade química entre as drogas e os componentes fisiológicos da parede celular confere um alto poder de resistência. A exemplo, sabe-se que os LPS contribuem intrinsecamente para o alto nível de resistência à polimixina B apresentado pela *B. pseudomallei* (SIRITAPETAWEET et al., 2004).

A produção de β lactamase, também é outro mecanismo de resistência bastante descrito para *B. pseudomallei* (BIOT et al., 2013). É conveniente destacar que a produção de β -lactamase da classe A e da classe D (OXA-42 e OXA-43) resultou na resistência de alguns isolados clínicos aos antibióticos amoxiciclina/clavulanato e ceftazidima. Esse mecanismo de resistência tem bastante relevância, visto que é o único modo de clivagem dos antibióticos β -lactâmicos, até então descrito para *B. pseudomallei* (BRILHANTE et al., 2012a,b, SAROVICH et al., 2012; SCHWEIZER, 2012; BANDEIRA et al., 2013). Outro mecanismo de resistência relatado para *B. pseudomallei* é a deleção de cromossomos. Apesar de gerar consequências indesejadas para o funcionamento celular, a deleção de alvos utilizados pelos antimicrobianos inativa a ação desses fármacos, permitindo assim a sobrevivência da bactéria. A exemplo, esse tipo de mutação é bastante relatado como mecanismo de resistência a ceftazidima em cepas de *B. pseudomallei* (SCHWEIZER, 2012).

Outra forma de limitar o contato com a droga ocorre pela expressão de bombas de efluxo. Essas bombas, contribuem para a resistência intrínseca e adquirida em bactérias Gram negativas. Após o sequenciamento de cepas de *B. pseudomallei*, notou-se que essa bactéria codifica múltiplas bombas de efluxo pertencentes à família RND (K96243) (HOLDEN et al., 2004). Entretanto, apenas três delas foram caracterizadas detalhadamente, sendo essas AmrAB-OprA, BpeAB-OprB e BpeEF-OprC (CHAN et al., 2005; HAYDEN et al., 2012). Destaca-se que AmrAB-OprA foi a primeira descrita para *B. pseudomallei*, essa bomba é a responsável pela resistência intrínseca à aminoglicosídeos e macrolídeos observada em cepas clínicas e ambientais. Assim, a expressão dessa bomba é a principal causa da não aplicabilidade desses antimicrobianos na terapêutica da melioidose; BpeAB-OprB é a bomba de

efluxo que utiliza como substratos os macrolídeos, fluoroquinolonas, tetraciclina e, em menor extensão, cloranfenicol; a resistência atualmente relatada à sulfametoxazol/trimetoprim é atribuída a ação da bomba BpeEF-OprC (BIOT et al., 2013).

Além da expressão de bombas de efluxo do tipo multidroga, as cepas de *B. pseudomallei* também podem apresentar resistência conferida pela formação de biofilme (ADLER et al., 2013). Acredita-se que essa tolerância não seja apenas associada à própria estrutura do biofilme e à diminuição da permeabilidade associada aos antimicrobianos, o que evita que as altas concentrações de drogas interajam com as células bacterianas. A produção e o acúmulo do biofilme protegido pela matriz extracelular também parece ser um mecanismo importante de resistência mediada pelo biofilme (HENGZHUANG et al., 2013).

2.10 Biofilmes de *B. pseudomallei*

2.10.1 Biofilme: um estilo de vida microbiano

A ideia de que os microrganismos são capazes de viver juntos e formar biofilmes é de fato antiga, remontando aos estudos clássicos e primordiais de Antonie van Leeuwenhoek (1632-1723) e nos anos 70 (CONSTERTON et al., 1978; FLEMMING; WINGENDER, 2010), que relataram o conceito de “agregação microbiana” na superfície dos dentes, e Louis Pasteur (1822-1895) 70 (CONSTERTON et al., 1978; FLEMMING; WINGENDER, 2010). Geralmente, os biofilmes são definidos como comunidades de microrganismos adequadamente organizados (como um típico sistema de cooperação social) ligados a um substrato inerte ou vivo e incorporado em uma matriz extracelular autoproduzida (também chamada de substância polimérica extracelular) composta de glicoproteínas, glicolipídios, mono sacarídeos, polissacarídeos, DNA extracelular, minerais e água, que funciona como um adesivo favorecendo as interações célula-célula e substrato celular (FLEMMING et al., 2016; PAPENFORT; BASSLER, 2016; ABISADO et al., 2018). Além disso, a matriz extracelular do biofilme pode conter componentes derivados do hospedeiro, tais como soro humano, glicoproteínas da saliva e secreções vaginais (FLEMMING et al., 2016).

Os constituintes químicos da matriz extracelular são responsáveis pela manutenção da arquitetura do biofilme, estabilizando-a através da formação de interações intermoleculares, cross-linkages de cátions multivalentes e uma rede de biopolímeros (FLEMMING et al., 2016). Todas essas propriedades da matriz extracelular ajudam a formar um abrigo robusto que oferece um nicho ecológico protegido e nutricionalmente rico, contribuindo para a sobrevivência microbiana, as trocas de moléculas, a comunicação (por meio da detecção de quórum), a sinalização e proliferação (FLEMMING et al., 2016). A matriz extracelular é uma estrutura extremamente dinâmica que é constantemente remodelada para se adequar ao ambiente e às condições de vida das células, além de proporcionar estabilidade físico-química à arquitetura do biofilme (MAURA et al., 2016; STARKEY et al., 2014).

2.10.2 Formação de biofilmes

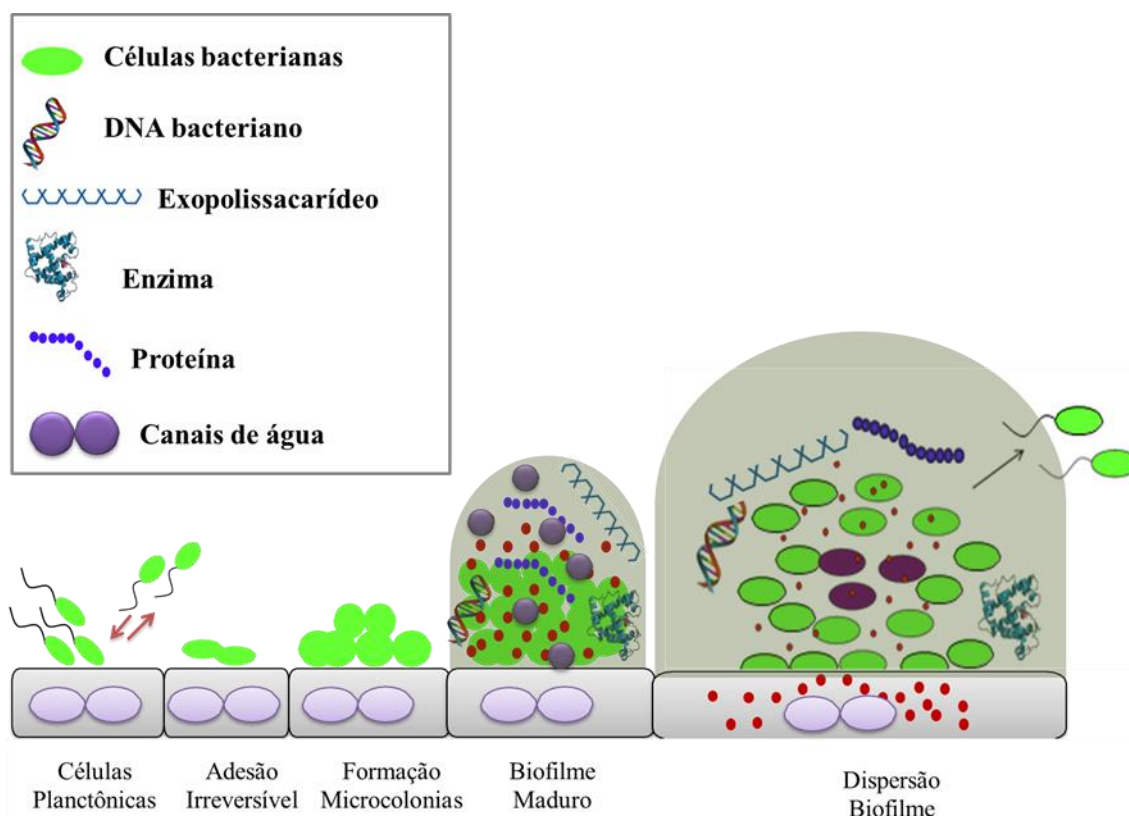
A formação de biofilme é um fenômeno sequencial, finamente orquestrado, em várias etapas, controlado por vários fatores físicos, químicos e biológicos (KOO et al., 2017; KUMAR, et al., 2017). Na formação do biofilme ocorre várias etapas incluindo adesão reversível, adesão irreversível, formação de microcolônias, maturação e dispersão celular (DESAI et al., 2014; LIMMATHUROTSAKUL et al., 2014; CASTELO-BRANCO et al., 2016). Durante essas fases, os biofilmes microbianos formam estruturas tridimensionais (3D) que são separadas por canais de água que permitem a entrada de nutrientes e oxigênio, bem como a descarga de resíduos. Além disso, a criação de uma miríade de microambientes dentro da comunidade de biofilme permite interações microbianas complexas, incluindo comunicação química e eletroquímica célula a célula e também a transferência horizontal aprimorada de genes (Figura 8).

Primeiramente ocorre a adesão reversível de bactérias planctônicas que se aproximam da superfície sólida por fluido ou por motilidade. Em superfície biótica, a aderência é auxiliada pelos fluidos corporais que revestem a superfície, isso ocorre porque a composição desses líquidos pode alterar a afinidade de um micro-organismo pela superfície. Nessa fase, a adesão é mediada por interação hidrofóbica e por forças de Van der Waals, nesse estágio, as bactérias ainda apresentam movimento Browniano e são facilmente removidos por lavagem da superfície. Em seguida, a transição para a

forma irreversível de adesão, a qual se dá por meio de interações dipolo-dipolo, pontes de hidrogênio, ligações iônicas, covalentes e por mecanismos moleculares específicos. Adicionalmente, nessa fase, para auxiliar na fixação *B. pseudomallei* possui pili tipo IV ou fímbrias, que medeiam adesão célula-a-célula, dificultando assim a remoção do biofilme (LIMMATHUROTSAKUL et al., 2014). Após esse processo de fixação, *B. pseudomallei* utiliza-se de suas características inatas para estruturar o biofilme, uma delas é a capacidade de produzir uma matriz hiperidratada de polissacarídeos. Assim esse processo, facilita a ligação intercelular, gerando a formação de microcolônias que, por fim, tornam-se protegidas por matriz de EPS que irá caracterizar a sua arquitetura (WHITE, 2003; LIMMATHUROTSAKUL et al., 2014).

No desenvolvimento de microcolônias dentro do biofilme maduro, as substâncias poliméricas extracelulares continuam a ser formadas juntamente com canais de água e poros. Dessa forma, o objetivo desses canais é permitir o fornecimento de nutrientes e gases, de forma igualitária, bem como a remoção de produtos residuais (PERCIVAL et al., 2012). Após o biofilme atingir a sua densidade populacional máxima ocorre a dispersão de células do biofilme na forma de células planctônicas e forma novos focos de biofilme.

Figura 8. Diferentes etapas de formação do biofilme.



Fonte: OCADAQUE, 2019.

- 1) Adesão reversível; 2) Adesão irreversível; 3) Desenvolvimento da estrutura do biofilme; 4) Formação de microcolônias dentro do biofilme maduro; 5) Dispersão de células.

2.10.3 *Quorum sensing*

Numerosas espécies de bactérias empregam um mecanismo de comunicação intercelular conhecido como *quorum sensing*. Esse processo de sinalização permite que as células compreendendo uma colônia bacteriana coordenem a sua expressão gênica de um modo dependente da densidade celular (YONG et al., 2013; DELCARU et al., 2016).

O mecanismo de *quorum sensing* (QS) consiste na produção e liberação de moléculas de sinalização para o meio, provocando a expressão de vários genes (ROMERO et al., 2012). Essa comunicação possibilita às bactérias executarem funções biológicas importantes, muitas delas envolvidas com a virulência desses patógenos. Além disso, tem sido demonstrado que o *quorum sensing* desempenha um papel na adesão celular, conferindo ao biofilme uma maior proteção em relação aos agentes antimicrobianos (ANTUNES, 2003).

Os diferentes tipos de sinais do *quorum sensing* são chamados de auto-indutores e foram identificados, na maioria dos casos, como moléculas orgânicas que se difundem livremente pela célula e fora dela. Existe uma vasta gama de moléculas sinalizadoras, como Oligopeptídeos, acil-homoserinalactona (AHL - AI-1) e Furanosil borato diéster (AI-2) (KALIA et al., 2012). O sinal de QS mais estudado e conhecido é o acil-homoserinalactona, o qual é utilizado por várias bactérias Gram-negativas (ROMERO et al, 2012), e é composto por duas proteínas, o sinal de síntese LuxI responsável pela produção de AHL e LuxR que é o receptor de AHL. Bactérias Gram-positivas usam oligopeptídeos, seus receptores estão ligados à membrana e o sinal ocorre através de cascatas de fosforilação (ROMERO et al., 2012). O *quorum sensing* participa das primeiras etapas para a formação do biofilme bacteriano. Nesse sentido, após formado, o biofilme torna-se irreversível e, por essa característica, é um problema para qualquer indivíduo que, por algum motivo, possua as condições favoráveis à sua formação.

Atualmente, a modulação de *quorum sensing* é uma importante estratégia para combater a expressão de fatores de virulência microbianos, dentre eles, a formação de biofilmes (WAHMAN et al., 2015). Diversos estudos demonstram que a interferência nesse sistema impede a formação de biofilmes e torna os micro-organismos mais sensíveis aos antimicrobianos (CASTELO-BRANCO et al., 2016; SIDRIM et al., 2017; SINGH et al., 2017). Dessa forma, a inibição do sistema de *quorum sensing* pode ser uma estratégia eficaz para combater infecções causadas por micro-organismos resistentes, principalmente, quando associadas ao crescimento de biofilmes (SINGH et al., 2017).

2.10.4 *Burkholderia pseudomallei* associado a biofilmes

Estima-se que 80% de todas as infecções bacterianas sejam causadas pela formação e persistência de biofilmes no hospedeiro (ALLISON et al., 2011), inclusive nas infecções por *B. pseudomallei*. As recidivas ou recorrências da melioidose normalmente são causadas pela mesma cepa bacteriana, a qual não foi eliminada devido à antibioticoterapia inadequada ou, principalmente, devido à resistência *in vivo* associada à formação de biofilme (PITT et al., 2007). Assim, a formação de biofilme por esse patógeno vem ganhando destaque nos últimos anos. Estudos recentes mostram que *B. pseudomallei*, quando em biofilme, é mais resistente aos

antimicrobianos, o que pode contribuir para a dificuldade do tratamento da melioidose (SAWASDIDOLN et al., 2010; BANDEIRA et al., 2013a). Ademais, foi demonstrado que a capacidade de uma cepa de *B. pseudomallei* produzir biofilme *in vitro* está associada à ocorrência de recidiva em pacientes com melioidose (LIMMATHUROTSAKUL et al., 2014).

Sabe-se que em *B. pseudomallei* a regulação da maturação e da manutenção de biofilmes, bem como a secreção de alguns fatores de virulência são orquestradas por mecanismos de *quorum sensing* (SONG et al., 2005). Nesta espécie bacteriana, as moléculas octanoil homosserina lactona (8HSL) e outras homosserina lactonas (HSLs) são as moléculas autorreguladoras produzidas para a comunicação intercelular e regulação (LASARRE; FEDERLE, 2013; GAMAGE et al., 2011). Além disso, ao controle da dinâmica de formação e de manutenção do biofilme, o sistema de *quorum sensing* de *B. pseudomallei* também é responsável pela regulação da síntese e secreção de fatores de virulência (SONG et al., 2005).

Assim, considerando a dificuldade do manejo de biofilmes, inúmeras pesquisas vêm sendo realizadas buscando compreender e controlar estas estruturas bacterianas (CHAN et al., 2007a; GAMAGE et al., 2011; FEDERLE, 2013; SOLANO et al., 2014; LASARRE). Dessa forma, os biossurfactantes, inibidores de bombas de efluxo, os inibidores de *quorum sensing* e moduladores de *quorum sensing* podem ser uma estratégia eficaz para combater infecções causadas por microorganismos resistentes, principalmente, quando associadas ao crescimento de biofilmes (TRENTIN et al., 2013; BANDEIRA et al., 2017; BLANCO et al., 2018).

2.10.5 Compostos potencialmente utilizados para modulação de biofilmes

Apesar dos antibióticos serem extremamente importantes para o tratamento de muitas infecções, com o passar dos anos, a resistência a essas drogas vem aumentando, exigindo o desenvolvimento de novos antimicrobianos ou de novas estratégias terapêuticas para infecções (DASTIDAR et al., 2013). Muitas alternativas têm sido estudadas para tratar tais infecções. A exemplo, compostos naturais, biomoléculas ou compostos utilizados clinicamente para outras finalidades, mas que possuem efeito antimicrobiano ou tem a capacidade de modular o biofilme, agindo em algumas das etapas da formação do biofilme. Por exemplo, tem sido testado compostos com potencial antibiofilmes isoladamente ou combinados com

antimicrobianos clássicos para tratar ou potencializar o efeito de antimicrobianos, como também evitar a formação de biofilmes (JORGE, LOURENÇO PEREIRA, 2012; CASTELO BRANCO et al, 2016; SIDRIN et al, 2017; ALTERIS et al, 2018).

Dessa forma, compostos não antimicrobianos clássicos, como biossurfactantes, inibidores de bomba de efluxo, inibidores de *quorum sensing* e moduladores de *quorum sensing*, tornam-se ferramentas de grande importância na busca por novos adjuvantes terapêuticos que podem atuar como antimicrobianos ou como adjuvantes terapêuticos, por tornar os micro-organismos mais sensíveis às drogas (LASSERE; FEDERLE, 2013).

2.10.6 Biossurfactante (ramnolipídio)

Os surfactantes são moléculas anfipáticas com capacidade de reduzir a tensão superficial e interfacial entre líquidos, sólidos e gases. Esses compostos são identificados pela presença de duas porções em sua estrutura, uma hidrofóbica e outra hidrofílica, responsáveis pelas propriedades únicas dos surfactantes: detergência, atividade emulsificante, lubrificação, capacidade espumante, capacidade molhante, além de solubilização e dispersão de compostos hidrofóbicos em fases aquosas (LUNA et al., 2016; NITSCHKE; PASTORE, 2002; SOUZA et al., 2018a). Embora os surfactantes químicos possuam inúmeras aplicações, sua utilização pode causar diversos impactos ambientais. Por esse motivo, nos últimos anos tem-se intensificado a busca por surfactantes biológicos, os quais possuem propriedades ecologicamente interessantes, como baixa toxicidade, elevada seletividade e biodegradabilidade, baixos valores de concentração e estabilidade em condições extremas de temperatura, pH e salinidade.

Uma das classes de biossurfactantes é representada pelos ramnolipídios (RL), surfactante aniônico produzido em sua grande maioria por *Pseudomonas aeruginosa* (PENG et al., 2012). Os ramnolipídios são glicolipídeos contendo um grupo hidrofílico, consistindo em uma ou duas moléculas de (L) -rhamnose, com uma ligação glicosídica ao grupo hidrofóbico composto de um ou dois ácidos graxos β -hidroxi (CHONG H, LI, Q, 2017). O ramnolipídio exibe excelentes propriedades emulsificantes, assim como apresentam ação antibacteriana, antifúngicas e propriedades antivirais e antiadesivas contra microrganismos patogênicos. No

entanto, o foco atual das pesquisas é a capacidade dos biossurfactantes de interromper biofilmes estabelecidos e impedir a formação de novos biofilmes.

Dentre as inúmeras propriedades atribuídas ao ramnolipídio, destaca-se seu potencial atividade na adesão bacteriana e na dispersão do biofilme. Sabe-se que esse composto apresenta atividade inibitória do crescimento bacteriano, tais como *Pseudomonas aeruginosa* (PERFUMO et al., 2006), *Bordetella bronchiseptica* (IRIE et al., 2005), *E. coli* (WANG et al., 2010), *S. aureus* (JIN et al., 2010), *S. epidermidis* (GOMES et al., 2011), *S. mutans* (HOREV et al., 2015) e fungos, como *Yarrowia lipolytica* (RODRIGUES et al., 2006), dentre outros.

O ramnolipídio também demonstra ser eficaz contra os biofilmes em formação (IRIE et al. 2005). Pensa-se que o mecanismo de inibição do biofilme seja na adesão celular. No entanto, algumas células desagregadas ainda podem ser viáveis. Foi relatado que o ramnolipídio interrompe biofilmes pré-formados, resultando em uma dispersão dos componentes da matriz do biofilme (DUSANE et al. 2010).

Ademais, o ramnolipídio demonstra-se ser agente de dispersão eficaz para fungos, interrompendo a formação de biofilmes de *Yarrowia lipolytica* em dispositivos médicos (RODRIGUES et al. 2006). É importante ressaltar que, embora os ramnolipídios possam efetivamente interromper a formação e a integridade do biofilme, essas moléculas também são conhecidas por interferirem na produção de fatores de virulência relacionadas ao patógeno (RODRIGUES et al. 2006).

2.10.7 O inibidor de bomba de efluxo carbonil cianeto m-clorofenil-hidrazona

O composto carbonil cianeto m-clorofenil-hidrazona (CCCP) ($C_9H_5ClN_4$) é um desacoplador da fosforilação oxidativa que bloqueia o transporte intracelular de glicoproteínas secretadas na membrana, esse mecanismo envolve o desacoplamento do gradiente de prótons que é estabelecido durante a atividade normal dos transportadores de elétrons na cadeia de transporte de elétrons, afetando a síntese de ATP (SINHA et al., 2017; MENICHINI et al., 2019). O CCCP também afeta consideravelmente o nível de energia da membrana e a viabilidade celular, causando uma dissipação da força motriz do próton da membrana, afetando consequentemente a síntese de ATP.

Além de sua alta toxicidade para a célula, CCCP é descrito como um inibidor clássico de bombas de efluxo, que participam de diversos mecanismos microbianos fisiológicos e homeostase dos biofilmes (ALVARADO, VASSEUR, 1998; MAHAMOUD et al. 2007). As bombas de efluxo são proteínas transportadoras que promovem a extrusão de qualquer substância tóxica de dentro da célula para fora inclusive de várias classes de antimicrobianos (DASTIDAR et al., 2013; SIDRIM et al., 2017).

Adicionalmente, Ikonomidis et al. (2008) propuseram que, devido às propriedades lipofílicas do composto, esse torna-se capaz de ligar-se à membrana celular, causando a ruptura mecânica de sua estrutura e, finalmente, a inviabilidade da célula. Sabe-se também que o CCCP possui atividade inibitória reconhecida frente às bombas de efluxo, aumentando o contato dos fármacos com os componentes celulares e exacerbando assim sua ação antimicrobiana (MAHAMOUD, et al. 2007; IKONOMIDIS et al., 2008).

Brilhante et al. (2012) relatou que cepas de *B. pseudomallei* foram sensíveis à ação antimicrobiana do farnesol um inibidor de bomba de efluxo, bem como a combinação desse composto com antibióticos β lactâmicos reduziu, de forma sinérgica, a concentração inibitória mínima (CIM) desses antimicrobianos.

Em relação à sua atividade frente a biofilmes, há relatos de que o CCCP é capaz de danificar a estrutura do biofilme bacteriano, reduzindo sua biomassa (MAHAMOUD, et al. 2007, ALVARADO E VASSEUR, 1998). Além dessa ação desestabilizadora, o composto atua sinérgicamente com antibióticos β -lactâmicos e com aqueles que interferem na síntese proteica do micro-organismo (JABRA-RIZK et al., 2006).

2.10.8 Inibidores de quorum sensing

A principal característica do biofilme bacteriano é a sua resistência à ação de moléculas antimicrobianas. Por essa razão, o maior interesse é descobrir formas de evitar ou reduzir a formação do biofilme. Com base nos estudos citados, o mecanismo de *quorum sensing* está ligado inteiramente à etapa inicial de formação do biofilme. Logo, a inibição do *quorum sensing* se torna o primeiro alvo no que se refere aos mecanismos de interrupção da formação do biofilme.

Portanto, a interrupção da sinalização baseada em AHL tornou-se a estratégias promissora para controlar a formação do biofilme (KALIA et al., 2012). São citados na literatura três possíveis mecanismos que podem interceptar a detecção do *quorum sensing* baseados em AHL ou modulando o seu comportamento durante a formação do biofilme, que incluem: inibição da síntese de AHL, bloqueando as proteínas da sintase (GESKE et al., 2008; KALIA et al., 2012), interferência nos receptores de sinal (KOCH et al., 2005) e degradação enzimática ou alteração das moléculas de AHLs (YATES et al., 2002; LIN et al., 2003). O bloqueio dessa sinalização, além de impedir a formação do biofilme, torna as bactérias mais sensíveis às drogas antimicrobianas e ao próprio sistema imunológico (ANTUNES, 2003; RUTHERFORD et al., 2012).

Os inibidores de *quorum sensing* podem ser de ordem natural, que engloba tanto substâncias produzidas por eucariotos, quanto por procariotos, ou de origem sintética, que são moléculas análogas produzidas em laboratório (KALIA et al., 2012), como furaneol e curcumina que interfere no sistema de *quorum sensing* (RUDRAPPA et al., 2008; PONNUSAMY et al., 2009).

A curcumina ($C_{21}H_{20}O_6$) é um polifenol, tido como um nutracêutico, derivado do rizoma de açafrão (*Curcuma longa*), planta pertencente à família do gengibre (HEWLINGS; KALMAN, 2017). Desde os tempos antigos, a raiz do açafrão tem sido popular como tempero na Índia e em outros países asiáticos. Também é comumente usado para fins medicinais, particularmente no tratamento de condições inflamatórias (JURENKA, 2009). Além de possuir atividade anti-inflamatória, antioxidante, hipoglicêmica, cicatrizante, antimutagênica e anticancerígena, a curcumina também apresenta atividade antimicrobiana comprovada, inibindo totalmente o crescimento *in vitro* de *Helicobacter pylori* (MAHADY et al., 2002; GUPTA; PATCHVA; AGGARWAL, 2013).

Por sua capacidade de intervir no *quorum sensing*, tendo como alvo moléculas sinalizadoras, a curcumina pode atuar de diversas formas contra os micro-organismos, diminuindo a produção de fatores de virulência, como proteases e sideróforos, e também impedindo a formação de biofilmes, como demonstrado no estudo com *Aeromonas sobria* feito por um grupo de pesquisadores da China (DING et al., 2017).

Dentre as inúmeras propriedades atribuídas ao curcumina, destaca-se seu potencial atividade antimicrobiana. Sabe-se que esse composto apresenta atividade inibitória do crescimento de bactérias, tais como *Streptococcus mutans* (DUARTE et al., 2006), *Aeromonas hydrophila* (ABUELSAAD et al., 2014), *Candida albicans* (ALALWAN et al., 2017), *S. aureus* (LEE et al., 2012) e *Escherichia coli* O157:H7 (LEE et al., 2011), dentre outros.

A curcumina tem ação antibacteriana, alguns autores relataram que a alteração na membrana pela curcumina pode ser atribuída a ação bactericida (CHARMA et al., 2014; TYAGI et al., 2015). A curcumina sendo anfipática e lipofílica, é facilmente incorporada a membrana bacteriana, resultando em sua rotura e vazamento (TYAGI et al., 2015). Por outro lado, o efeito antibiofilme é o resultado da modulação da expressão genica e da inibição da detecção de *quorum sensing*. Ademais, a curcumina também possui a capacidade de agir sinergicamente com várias drogas de diferentes classes, como a cloroquina, utilizada para tratar malária e diminuir a resistência de cepas de *Plamosdium falciparum* resistentes a cloroquina (REDDY et al., 2005; TEOW et al., 2016).

Ademais, o furaneol (C₆H₈O₃) é um composto aromático não halogenado, extraído de frutas, e muito utilizado na indústria alimentícia. Além disso, a sua atividade antimicrobiana, anti-carcinogênica e antioxidante já foi comprovada (CHOI et al., 2014; SCHWAB, 2013).

Recentemente, devido à busca por novas alternativas terapêuticas, ele se tornou um forte candidato para combater infecções e controlar fatores de virulência regulados por moléculas auto-indutoras, como no caso das AHLs em *Pseudomonas aeruginosa*, responsáveis por sinalizar a produção de toxinas, lipases, proteases e a formação de biofilmes (CHOI et al., 2014). Nesse estudo, foram testadas concentrações abaixo da concentração inibitória mínima (CIM), demonstrando uma eficiente inibição da expressão de fatores de virulência e da produção de biofilmes por *P. aeruginosa* (CHOI et al., 2014).

Diferentemente da furanona halogenada, que já possui relatos na literatura de resistência microbiana associada ao seu uso, o furaneol é um composto não halogenado e menos tóxico, logo, podendo não forçar uma pressão seletiva em micro-

organismos ou forçar uma menor pressão, graças a sua baixa toxicidade (CHOI et al., 2014). O furaneol inibe a colonização bacteriana e o desenvolvimento de biofilme através da interferência nas moléculas de homoserinas lactonas (AHL) em bactérias Gram negativas e o sistema de sinalização AI-2 em bactérias Gram positivas. Além disso, o furaneol inibe a expressão de exoenzimas bacterianas que degradam ativamente os componentes do sistema imunológico, melhorando, assim, a resposta imune.

Wu et al., (2004) em um estudo *in vivo*, mostrou que furaneol interfere no mecanismo de ação de AHL suprimindo a detecção de *quorum sensing* bacteriana. Também o furaneol acelera a depuração bacteriana pulmonar além de prolongar significativamente o tempo de sobrevivência dos ratos (WU et al., 2004).

2.10.9 Moléculas de *quorum sensing* (8HSL)

Na literatura, podem ser encontradas duas classes de enzimas capazes de degradar as moléculas sinalizadoras AHL: as lactonases, que hidrolisam o anel lactona e as ocilases, que hidrolisam a ponte amida entre a cadeia de ácido graxo e a molécula de homosiderina lactona (LIN et al., 2003; STEGGLES, 2011).

Os moduladores de *quorum sensing* podem ser de ordem natural, que engloba substâncias de origem sintética, que são moléculas análogas produzidas em laboratório (KALIA et al., 2012), como octanoil homoserina lactona (8HSL) que age competitivamente com as AHL pelos receptores cognatos (RUDRAPPA et al., 2008; PONNUSAMY et al., 2009). Entretanto já foi demonstrado que a modulação de *quorum sensing* mediado pela inibição da síntese de AHL pode ser uma estratégia eficaz para desconectar a sinalização célula a célula, no entanto, atualmente, existem poucos estudos com uma investigação completa de pequenas moléculas direcionadas à produção do sinal. Estudos investigaram o potencial do uso de análogos da S-adenosilmetionina (SAM), que é o doador de amino para a formação da porção do anel da homoserina lactona. Três análogos, S-adenosil-homocisteína 47a, sinefungina 47b e butiril SAM inibem *P. aeruginosa* e bloqueiam a produção de AHL *in vitro* (PARSEK et al., 1999).

Romero et al., (2010) mostra que o composto octanoil homoserina lactona (8HSL) antagonista obtido de forma química, interfere no mecanismo de *quorum*

sensing, proporcionando um efeito antagonista ou até mesmo reduzindo a expressão de genes, por apresentar uma estrutura semelhante a uma parte da molécula de AHL (PERECHE et al., 2001). Outro mecanismo de ação é a interferência antagônica nos receptores de sinal de AHL inibindo as moléculas de *quorum sensing* (HENTZER et al., 2003).

Já foram demonstrados que 8HSL atua contra homoserina lactonas, interferindo nos mecanismos de *quorum sensing* bacteriano e, conseqüentemente na formação de biofilme por bloquear a comunicação célula a célula (MIMA; SCHWEIZER, 2010; CHAN et al., 2007a)

Quadro 2. Compostos utilizados como potenciais moduladores de biofilmes de *B. pseudomallei*

Composto	Mecanismo de ação	Referências
Ramnolipídio	Biossurfactante	LUNA et al., 2016
CCCP	Inibidor de bomba de efluxo	MAHAMOUD, et al. 2007 IKONOMIDIS et al., 2008
Curcumina	Inibidor de <i>quorum sensing</i>	CHARMA et al., 2014 TYAGI et al., 2015
Furaneol	Inibidor de <i>quorum sensing</i>	ALASIL et al., 2015
8HSL	Modulador de <i>quorum sensing</i>	SOLANO et al., 2014 HAYEK et al., 2019

CCCP: Carbonil cianeto m-clorofenil-hidrazona

8HSL: Octanoil homoserina lactona

Diante do exposto, o presente trabalho propôs a analisar a atividade inibitória do ramnolipídio, CCCP, curcumina, furaneol e 8HSL frente aos biofilmes de *B. pseudomallei* e secreção de fatores de virulência, bem como avaliar se a associação desses compostos interfere na ação dos antimicrobianos convencionalmente usados no tratamento de melioidose.

Hipótesis científicas

3. HIPÓTESES CIENTÍFICAS

O biossurfactante ramnolipídio atua contra biofilmes maduros de *B. pseudomallei*, reduzindo a biomassa e a produção de proteases e sideróforos.

O inibidor de bombas de efluxo carbonil cianeto m-clorofenil-hidrazona inibe a formação de biofilmes e desestrutura biofilmes maduros de *B. pseudomallei*, reduz a produção de proteases e sideróforos e sensibiliza os biofilmes aos antimicrobianos.

Os inibidores de *quorum sensing* curcumina e furaneol reduzem a formação de biofilmes e a produção de proteases, mas não interferem na sensibilidade antimicrobiana de biofilmes de *B. pseudomallei*.

A molécula de *quorum sensing* ocatanoil-homosserina lactona (8HSL) aumenta a produção de biofilmes, desestrutura biofilmes maduros, aumenta a produção de proteases e sideróforos e sensibiliza biofilmes de *B. pseudomallei* a drogas antimicrobianas.

Objetivos

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo geral

Avaliar o efeito do biossurfactante ramnolipídio, do inibidor de bombas de efluxo carbonilcianeto m-clorofenil-hidrazona (CCCP), dos inibidores de *quorum sensing* curcumina e furaneol e da molécula de *quorum sensing* octanoil homoserina lactona (8HSL) sobre a sensibilidade antimicrobiana, a dinâmica de biofilmes e a virulência de *Burkholderia pseudomallei*.

4.2 Objetivos específicos

- 1- Testar o efeito *in vitro* dos antibacterianos doxiciclina, imipenem, ceftazidima amoxicilina-clavulanato e trimetoprim-sulfametoxazol e dos compostos (ramnolipídio, CCCP, curcumina, furaneol e 8HSL) isolados ou associados sobre a forma planctônica e de biofilme de cepas clínicas e ambientais de *B. pseudomallei*;
- 2-Avaliar o efeito dos compostos (ramnolipídio, CCCP, curcumina, furaneol e 8HSL) sobre a dinâmica de formação e de manutenção de biofilmes de cepas clínicas e ambientais de *B. pseudomallei*;
- 3- Analisar o efeito dos compostos (ramnolipídio, CCCP, curcumina, furaneol e 8HSL) sobre a produção de proteases e de sideróforos por bactérias de crescimento livre e por biofilmes em formação e biofilmes maduros de *B. pseudomallei*;
- 4- Identificar por microscopia confocal as alterações estruturais nos biofilmes em formação e biofilmes maduros de *B. pseudomallei* expostos aos compostos (ramnolipídio, CCCP, curcumina, furaneol e 8HSL).

Materialis e Métodos

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1 Local de estudo

Este estudo foi desenvolvido no Laboratório de Patógenos Emergentes e Reemergentes- LAPERE pertencente ao Centro Especializado em Micologia Médica (CEMM) do Departamento de Patologia e Medicina Legal da Faculdade de Medicina (UFC) e no Grupo Aplicado em Microbiologia Médica (GraMM).

5.2 Micro-organismos

Nesse estudo, foram avaliados isolados clínicos (n= 08) e ambientais (n=08) de *B. pseudomallei*, isoladas no Estado do Ceará. A tabela 1 apresenta a relação das cepas empregadas na pesquisa, bem como a origem e o número de depósito na coleção do LAPERE. Essas cepas foram identificadas por meio bioquímico, no equipamento VITEK2®, e a identificação foi confirmada pelo sequenciamento da região 16S do DNA. Os microrganismos foram recuperados em caldo BHI (Brain Heart Infusion), a 37 °C, por 48 h. A pureza das cepas foi confirmada em meio Ashdown. Todas as 16 cepas de *B. pseudomallei* utilizadas neste estudo foram previamente caracterizadas como fortes formadoras de biofilme.

Por ser classificada como um agente biológico de classe de risco 3, a manipulação de *B. pseudomallei* deve estar condizente com os critérios estabelecidos pelo Ministério da Saúde. Para tanto, todos os experimentos foram realizados em cabine de fluxo laminar II/B2, acondicionada no laboratório de nível de Biossegurança 3, onde há instalações físicas necessárias, procedimentos e normas que asseguram a contenção biológica deste micro-organismo. Adicionalmente, todos os resíduos gerados foram devidamente acondicionados e levados para autoclavação a 121°C, durante 30 minutos.

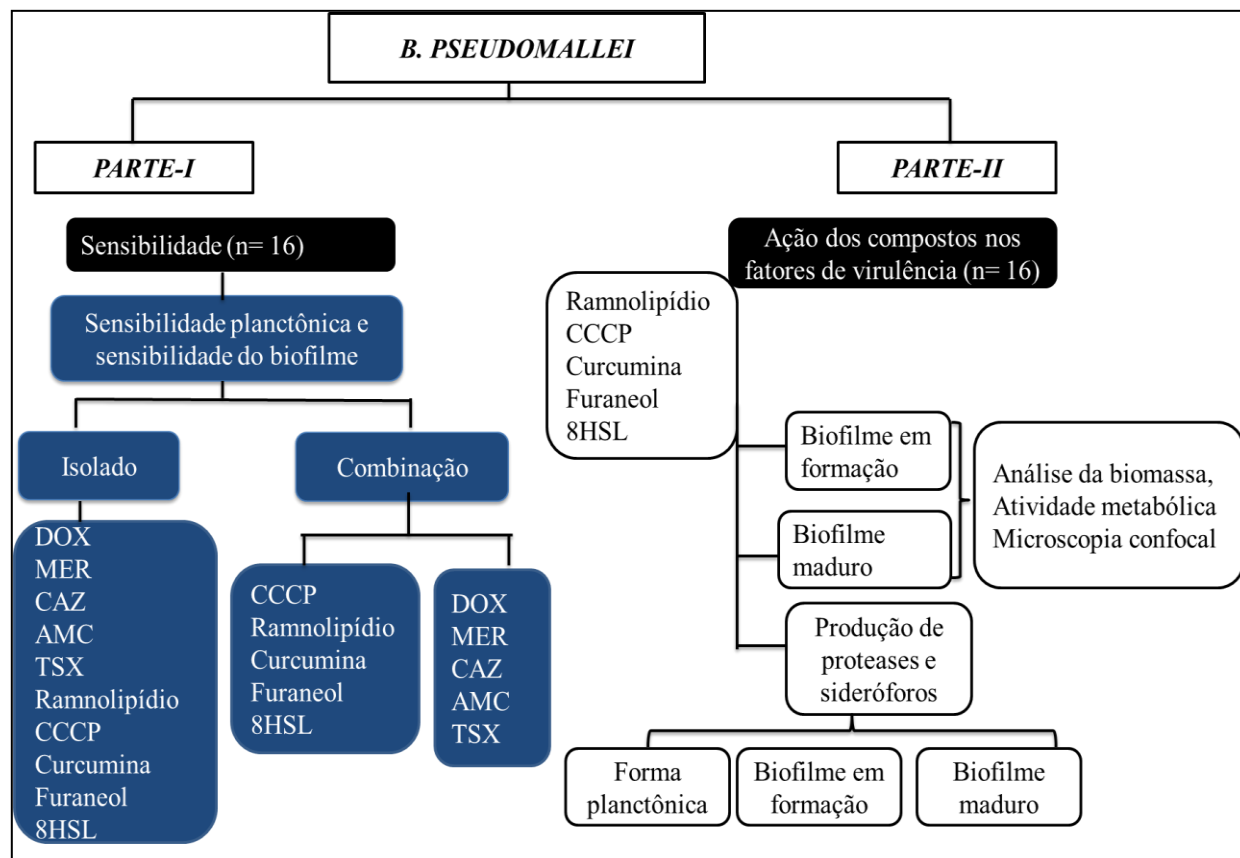
Tabela 1. Descrição das cepas utilizadas na pesquisa

Fonte de isolamento	Número da coleção CEMM	Origem do paciente/ Município de isolamento	Ano de isolamento
Clínica	CEMM 03-6-034	Tejuçuoca	2003
	CEMM 03-6-036	Ubajara	2008
	CEMM 03-6-038	Granja	2009
	CEMM 05-5-096	São Gonçalo	2012
	CEMM 05-6-089	São Gonçalo do Amarante	2012
	CEMM 05-6-091	Fortaleza	2014
	CEMM 05-6-092	Fortaleza	2014
	CEMM 05-6-093	Granja	2014
Ambiental	CEMM 03-6-039	Tejuçuoca	2007
	CEMM 03-6-040	Tejuçuoca	2007
	CEMM 03-6-041	Tejuçuoca	2007
	CEMM 03-6-042	Tejuçuoca	2007
	CEMM 03-6-043	Tejuçuoca	2007
	CEMM 03-6-046	Tejuçuoca	2007
	CEMM 03-6-047	Tejuçuoca	2007
	CEMM 03-6-048	Tejuçuoca	2007

5.2.1 Desenho experimental

Este trabalho foi organizado em duas etapas distintas. A primeira etapa consistiu na análise da sensibilidade das cepas testadas, na forma planctônica e de biofilme, aos antimicrobianos utilizados no tratamento da melioidose (doxiciclina, meropenem, ceftazidima, amoxicilina-clavulanato e trimetoprim-sulfametoxazol) e aos compostos, testes, i.e., o biossurfactante ramnolipídio, o inibidor de bombas de efluxo carbonilcianeto m-clorofenil-hidrazona (CCCP), os inibidores de quorum sensing curcumina e furaneol e a molécula de *quorum sensing* ocatanoil-homosserina-lactona (8HSL), isolados e combinados. Para fins didáticos, esses compostos serão conjuntamente chamados de reguladores de biofilmes. A segunda etapa consistiu em avaliar o efeito dos compostos reguladores sobre a dinâmica de formação e de manutenção de biofilmes e sobre a produção de fatores de virulência por *B. pseudomallei*, nas formas de crescimento livre, de biofilmes em formação e de biofilmes maduros. As análises das duas etapas experimentais foram conduzidas conforme desenho experimental apresentado na Figura 9.

Figura 9. Fluxograma do desenvolvimento da tese



Fonte: Autoria próprio

Biossurfactante: ramnolipídio

Inibidor de bomba de efluxo: carbonil cianeto m-clorofenil-hidrazona (CCCP)

Inibidores de *quorum sensing*: curcumina e furaneol

Molécula de *quorum sensing*: octanoil-homoserina-lactona (8HSL)

DOX: doxiciclina

MER: meropenem

CAZ: ceftazidima

AMC: amoxicilina-clavulanato

TSX: trimetoprim-sulfametoxazol

1ª PARTE EXPERIMENTAL

5.2.2 Preparo de inóculo para teste de sensibilidade

As cepas de *B. pseudomallei* (n=16) foram cultivados em caldo BHI glicose 1%, a 37 °C, por 24 horas. Após esse período, as colônias foram suspensas em 2 mL de solução salina estéril, a fim de atingir o padrão 0,5 na escala McFarland, equivalente a uma concentração de aproximadamente $1,5 \times 10^8$ unidades formadoras de colônias por mililitro (UFC/mL). Essa suspensão foi diluída na proporção de 1/150 em caldo Mueller Hinton (MH). Em seguida, foram acrescentados 100 µL do inóculo aos poços de uma placa de 96 poços de fundo em U, obtendo-se a concentração final de 5×10^5 UFC/mL (CLSI_2015).

5.2.3 Teste de sensibilidade às drogas antimicrobianas e aos compostos reguladores de biofilmes com *B. pseudomallei* na forma planctônica

Os testes de sensibilidade com *B. pseudomallei* (16 cepas) na forma planctônica foram realizados para determinação das concentrações inibitórias mínimas (CIMs) para os antimicrobianos e os compostos testados. Para tanto, os procedimentos foram realizados por meio do método de microdiluição em caldo Mueller-Hinton (Difco, EUA), conforme padronizado pelo documento M100-S25 (CLSI_2015). Os inóculos bacterianos foram preparados conforme descrito anteriormente. Os antibacterianos foram avaliados nas seguintes concentrações: 0,03-16 µg/mL para doxiciclina (DOX, Sigma-Aldrich) e meropenem (MER, Sigma-Aldrich), 0,25-128 µg/mL para ceftazidima (CAZ, Sigma-Aldrich), 0,5/0,250-256/128 µg/mL para amoxicilina-clavulanato (AMC, Sigma-Aldrich) e 0,59/0,03-304/16 µg/mL para trimetoprim-sulfametoxazol (TSX, Sigma-Aldrich). Os compostos reguladores foram avaliados nas seguintes concentrações: ramnolipídio (9,76–5000 µg/mL), CCCP (1-512 µM), curcumina (1-512 µM), furaneol (9,76–5000 µM) e 8HSL (0,19–100 µM) (Quadro 3). A CIM foi definida como a menor concentração capaz de inibir totalmente (100%) o crescimento visual do microorganismo, após 24 horas de incubação. Para alguns compostos a CIM não foi encontrada e foi levada em consideração a ocorrência de alterações visuais no crescimento microbiano. Poços livres de droga foram incluídos como controle de crescimento e poços livres de bactéria foram incluídos como controle de esterilidade.

Para o controle das drogas, foram utilizadas as cepas padrão *Escherichia coli* ATCC 25922 e *Staphylococcus aureus* ATCC 29213.

Quadro 3. Concentrações dos antimicrobianos e dos compostos reguladores de biofilmes testados isoladamente contra *Burkholderia pseudomallei* na forma planctônica e de biofilmes.

Drogas/Compostos	Solventes	Forma planctônica	Fabricante
Doxiciclina	H ₂ O	0,03-16 µg/mL	Sigma-Aldrich
Meropenem	H ₂ O	0,03-16 µg/mL	Sigma-Aldrich
Ceftazidima	NaHCO ₃	0,25-128 µg/mL	Sigma-Aldrich
Amoxicilina-clavulanato	PBS (pH=6.0)	0,5/0,250-256/128 µg/mL	Sigma-Aldrich
Trimetoprim-sulfametoxazol	NaCl/HCl	0,59/0,03-304/16 µg/mL	Sigma-Aldrich
Ramnoflipídio	H ₂ O	9,76–5000 µg/mL	Sigma-Aldrich
CCCP	DMSO	1-512 µM	Sigma-Aldrich
Curcumina	Etanol	1-512 µM	Sigma-Aldrich
Furaneol	H ₂ O	9,76–5000 µM	Sigma-Aldrich
8HSL	DMSO	0,05–100 µM µM	Sigma-Aldrich

CCCP: Carbonil cianeto m-clorofenil-hidrazona

8HSL: Octanoil-homoserina-lactona

5.2.4 Teste de sensibilidade às drogas antimicrobianas e aos compostos reguladores de biofilmes com biofilmes maduros de *B. pseudomallei*

Os testes de sensibilidade com biofilmes maduros foram realizados para determinação das concentrações eliminatórias mínimas do biofilme (CEMB) para os antimicrobianos e os compostos testados. Para tanto, foi induzida a formação de biofilmes por *B. pseudomallei* (16 cepas), em placas de poliestireno de 96 poços de fundo chato, contendo 175 µL de caldo BHI-glicose 1% e 25 µL de inóculo bacteriano, atingindo uma proporção de 7:1. Os inóculos foram preparados a partir de

repiques das cepas crescidas em caldo BHI, a 37 °C, durante 48 h, os quais foram suspensos em 2 mL de solução salina estéril, com turbidez 6 na escala de McFarland ($1,8 \times 10^9$ UFC/mL). Em seguida, os poços foram inoculados e as placas foram incubadas a 37 °C, durante 48h, para a obtenção de biofilmes maduros (PEETERS et al., 2008; BANDEIRA et al., 2013).

Após o período de incubação, os biofilmes formados foram expostos a concentrações crescentes dos antimicrobianos e dos compostos reguladores, de acordo com a metodologia descrita pelo CLSI (2015), com adaptações. Os poços foram lavados duas vezes com PBS 1x para remover as células não aderentes. Em seguida, 200 µL de caldo BHI-glicose 1%, contendo concentrações crescentes das drogas antimicrobianas ou dos compostos reguladores, foram adicionados aos poços. Os intervalos de concentrações testados foram: 0,03-16 µg/mL para doxiciclina (DOX, Sigma-Aldrich) e meropenem (MER, Sigma-Aldrich), 0,25-128 µg/mL para ceftazidima (CAZ, Sigma-Aldrich), 0,5/0,250- 256/128 µg/mL para amoxicilina-clavulanato (AMC, Sigma-Aldrich) e 0,59/0,03-304/16 µg/mL para trimetoprim-sulfametoxazol (TSX, Sigma-Aldrich). Quanto aos compostos reguladores de biofilmes, as seguintes concentrações foram testadas: ramnolipídio (9,76–5000 µg/mL), CCCP (1-512 µM), curcumina (1-512 µM), furaneol (9,76–5000 µM) e 8HSL (0,05–100 µM) (Quadro 3). Em seguida, as placas foram incubadas novamente, a 37 °C, durante 24h (PEETERS et al., 2008; BANDEIRA et al., 2013). Após a incubação foi avaliada a atividade metabólica do biofilme para determinação da viabilidade dos mesmos. Assim, foram adicionados 20 µL de resazurina (0,025%) em todos os poços da placa de microdiluição. As placas foram incubadas a 35 °C, sob abrigo da luz, por uma hora. Após esse período, foi realizada a interpretação visual dos resultados. A concentração eliminatória mínima do biofilme (CEMB) foi considerada a menor concentração na qual não há evidências de atividade metabólica celular, conseqüentemente, não ocorrendo mudança de coloração, ou seja, os poços permanecem azuis (Figura 10) (BANDEIRA et al., 2013).

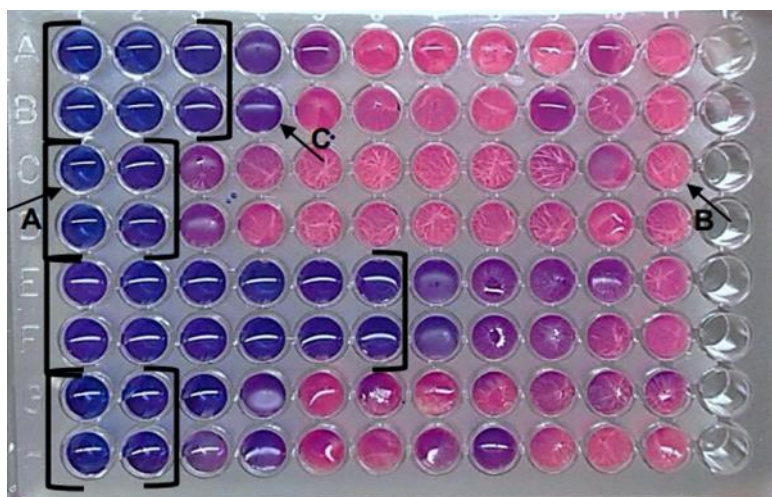


Figura 10. Visualização da placa de microdiluição de poliestireno com 96 poços de fundo chato com biofilme de *B. pseudomallei* após receber solução de resazurina a 0,025%. Entre os colchetes e na seta (A), visualizar os poços azuis, demonstrando a falta de atividade metabólica celular, sendo considerada a concentração eliminatória mínima do biofilme (CEMB). No restante da placa visualizamos poços com coloração variável de róseo, como visto na seta (B), a lilás como na seta (C), apresentando atividade metabólica celular.

Poços livres de droga foram incluídos como controle de crescimento e poços livres de bactéria foram incluídos como controle de esterilidade. Para o controle de qualidade, todos os testes foram realizados em triplicata, em dois momentos distintos, e as seguintes cepas controle foram usadas: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (produtor de biofilme) e *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228 (não produtor de biofilme).

5.2.5 Efeito dos compostos reguladores de biofilmes sobre a sensibilidade antimicrobiana de *B. pseudomallei* na forma planctônica e de biofilmes

Para avaliar os efeitos dos compostos reguladores sobre a sensibilidade planctônica de *B. pseudomallei* (16 cepas), foi utilizado o método de microdiluição em caldo Muller-Hinton, conforme descrito previamente, utilizando as drogas antimicrobianas no intervalo de concentração descrito no quadro 3. Entretanto, nessa

etapa experimental, os compostos reguladores foram incorporados ao caldo Muller-Hinton, em concentrações fixas (Quadro 4). As placas foram incubadas a 37 °C, durante 24h. Posteriormente, as CIMs dos antimicrobianos combinados com cada um dos compostos foram lidas, definidas como as menores concentrações de droga antimicrobiana capaz de inibir completamente o crescimento bacteriano. Poços livres de droga foram incluídos como controle de crescimento e poços livres de bactéria foram incluídos como controle de esterilidade. Para o controle das drogas, foram utilizadas as cepas padrão *Escherichia coli* ATCC 25922 e *Staphylococcus aureus* ATCC 29213.

Para avaliar os efeitos dos compostos sobre as CEMBs dos antimicrobianos, inicialmente, o crescimento de biofilmes maduros de *B. pseudomallei* foi induzido em placas de 96 poços de fundo chato, contendo caldo BHI-glicose 1%, conforme descrito anteriormente. As placas foram incubadas a 37 °C, durante 48 h (PEETERS et al., 2008; BANDEIRA et al., 2013). Após a incubação, os poços foram lavados duas vezes com PBS 1x e 200 µL de caldo BHI-glicose 1%, contendo concentrações crescentes das drogas antimicrobianas e concentrações fixas dos compostos reguladores, foram adicionados aos poços. As concentrações testadas estão descritas no (Quadro 4). Em seguida, as placas foram incubadas a 37 °C, por mais 24 h. Após a incubação, foram adicionados 20 µL da resazurina (0,025%) para determinação das CEMBs dos antimicrobianos combinados com cada um dos compostos (CASTELO-BRANCO et al., 2016).

Poços livres de droga foram incluídos como controle de crescimento e poços livres de bactéria foram incluídos como controle de esterilidade. Para o controle de qualidade, todos os testes foram realizados em triplicata, em dois momentos distintos, e as seguintes cepas controle foram usadas: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (produtor de biofilme) e *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228 (não produtor de biofilme).

Quadro 4. Concentrações dos antimicrobianos e compostos reguladores testados em combinação contra *B. pseudomallei* na forma planctônica e de biofilme.

Drogas/compostos	Biofilme formação	Fabricante
Doxiciclina	0,03-16 µg/mL	Sigma-Aldrich
Meropenem	0,03-16 µg/mL	Sigma-Aldrich
Ceftazidima	0,25-128 µg/mL	Sigma-Aldrich
Amoxicilina/clavulanato	0,5/0,250-256/128 µg/mL	Sigma-Aldrich
Trimetoprim-sulfametoxazol	0,29/0,015-152/8 µg/mL	Sigma-Aldrich
Ramnolipídeo	78 µg/mL	Sigma-Aldrich
CCCP	128 µM	Sigma-Aldrich
Curcumina	51,2 µM	Sigma-Aldrich
Furaneol	500 µM	Sigma-Aldrich
8HSL	7,8 µM	Sigma-Aldrich

CCCP: Carbonil cianeto m-clorofenil-hidrazona

8HSL: Octanoil-homoserina-lactona

2ª PARTE EXPERIMENTAL

5.3 Efeitos dos compostos reguladores de biofilmes sobre a formação de biofilmes por *B. pseudomallei*

Para avaliar a ação dos compostos sobre biofilmes em formação de *B. pseudomallei* (16 cepas), foram usadas três concentrações, sendo um referente à CIM, quando esta foi encontrada, e as outras referentes a duas concentrações sub-inibitórias, conforme descrito no (Quadro 5). Foi induzida a formação de biofilme em placas de 96 poços contendo caldo BHI-glicose 1%, conforme descrito anteriormente.

Os compostos foram incorporados ao meio, nas concentrações escolhidas. Em seguida as microplacas foram incubadas a 37 °C, durante 48 h. Finalmente os poços foram lavados por três vezes com PBS 1x estéril para remover as células não aderentes e a biomassa dos biofilmes foi quantificada pelo método de coloração com cristal violeta. Após a lavagem dos biofilmes com PBS, 200 µL de metanol (Dinâmica, Brasil) foram adicionados aos poços, agindo por 15 minutos. O metanol foi removido, e as placas foram secas dentro da cabine de fluxo laminar. Posteriormente, foram adicionadas aos poços alíquotas de 200 µL de cristal violeta a 0,3%, deixando-o agir por 10 minutos. Em seguida, o corante foi removido, as placas foram lavadas com PBS estéril três vezes. Após as lavagens, o corante impregnado nos biofilmes foi resolubilizado com 200 µL ácido acético 33% e o sobrenadante foi transferido para novas placas de microdiluição de fundo chato, as quais foram submetidas a leitura em espectrofotômetro a 490 nm (STEPANOVIĆ et al., 2007). Poços livres de droga foram incluídos como controle de crescimento e poços livres de bactéria foram incluídos como controle de esterilidade. Para o controle de qualidade, todos os testes foram realizados em triplicata, em dois momentos distintos, e as seguintes cepas controle foram usadas: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (produtor de biofilme) e *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228 (não produtor de biofilme). (BANDEIRA et al., 2013).

Quadro 5. Concentrações dos compostos reguladores de biofilmes testados contra biofilmes em formação de *Burkholderia pseudomallei*.

Compostos reguladores	Concentrações testadas	Fabricante
Ramnolipídio	0,78, 7,8, 78 µg/mL	Sigma-Aldrich
CCCP	1,28, 12,8, 128 µM	Sigma-Aldrich
Curcumina	25,6, 51,2, 512 µM	Sigma-Aldrich
Furaneol	250, 500, 5000 µM	Sigma-Aldrich
8HSL	0,78, 7,8, 78 µM	Sigma-Aldrich

CCCP: Carbonil cianeto m-clorofenil-hidrazona

8HSL: Octanoil-homosserina-lactona

5.3.1 Efeitos dos compostos reguladores de biofilmes sobre biofilmes maduros de *B. pseudomallei*

Para avaliar a ação dos compostos sobre biofilmes maduros de *B. pseudomallei* (16 cepas), foram usadas três concentrações, sendo um referente à CEMB, quando esta foi encontrada, e as outras referentes a duas concentrações sub-inibitórias, conforme descrito no (Quadro 6). Inicialmente, a formação de biofilme foi induzida em placas de 96 poços contendo caldo BHI-glicose 1%, conforme descrito anteriormente. Em seguida as microplacas foram incubadas a 37 °C, durante 48 h. Após esse período, os poços foram lavados três vezes com PBS 1x estéril para remover as células não aderentes, e 200 µL de caldo BHI-glicose 1%, contendo as três concentrações dos compostos testados, foram adicionados aos poços das placas. Em seguida, as placas foram incubadas a 37 °C, por mais 24 h, e a atividade metabólica e a biomassa dos biofilmes foi avaliada por meio do uso da rezasurina e pelo método de coloração com cristal violeta, conforme descrito anteriormente. Poços livres de droga foram incluídos como controle de crescimento e poços livres de bactéria foram incluídos como controle de esterilidade. Para o controle de qualidade, todos os testes foram realizados em triplicata, em dois momentos distintos, e as seguintes cepas controle foram usadas: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (produtor de biofilme) e *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228 (não produtor de biofilme) (BANDEIRA et al., 2013).

Quadro 6. Concentrações dos compostos reguladores de biofilmes testados contra biofilmes maduros de *Burkholderia pseudomallei*.

Compostos reguladores	Concentrações testadas	Fabricante
Ramnolipídio	7,8, 78, 780 µg/mL	Sigma-Aldrich
CCCP	64, 128, 512 µM	Sigma-Aldrich
Curcumina	25,6, 51,2, 512 µM	Sigma-Aldrich
Furaneol	250, 500, 5000 µM	Sigma-Aldrich
8HSL	0,78, 7,8, 78 µM	Sigma-Aldrich

CCCP: Carbonil cianeto m-clorofenil-hidrazona

8HSL: Octanoil-homoserina-lactona

5.3.2 Efeito dos compostos reguladores de biofilmes sobre a produção de proteases e de sideróforos

Os efeitos dos compostos reguladores sobre a produção de enzimas proteolíticas (proteases) e de sideróforos por *B. pseudomallei* (16 cepas) na forma planctônica e nas formas de biofilme em formação e de biofilme maduro foram avaliados, conforme Charney e Tomarelli (1947), com modificações descritas em Cordeiro et al. (2016). Para a análise na forma planctônica, as cepas foram incubadas em caldo BHI-glicose 1% (o mesmo utilizado para formação de biofilmes), utilizando uma proporção de 7:1 entre meio de cultura e inóculo bacteriano, semelhantemente ao que foi feito para induzir o crescimento de biofilmes. Assim, foram colocados em tubos de ensaio, 875 µL de caldo BHI-glicose 1%, contendo três concentrações, as mesmas utilizadas nos ensaios com biofilmes em formação, conforme descrito no (Quadro 5), e 125 µL de inóculo bacteriano na turvação de 6 na escala de McFarland. Para os ensaios utilizando biofilmes em formação, o crescimento de biofilmes foi induzido, em triplicata, em placas de poliestireno de 96 poços de fundo chato, em caldo BHI-glicose 1%, utilizando a proporção de meio e inóculo bacteriano de 7 (175 µL): 1 (25 µL), conforme descrito anteriormente. Os compostos reguladores foram incorporados ao meio de cultura, em três concentrações, as mesmas utilizadas nos ensaios com biofilmes em formação, conforme descrito no (Quadro 6). Os tubos e as placas foram incubados a 37 °C, por 48 h. Quanto aos biofilmes maduros, eles foram inicialmente formados em triplicata, segundo a metodologia previamente descrita, ao longo de 48 h, na ausência dos compostos reguladores. Após o período de incubação, o sobrenadante dos biofilmes foi removido, os biofilmes foram lavados três vezes com PBS estéril e 200 µL de meio BHI-glicose 1%, contendo três concentrações dos compostos reguladores, as mesmas utilizadas nos ensaios com biofilmes maduros, conforme descrito no (Quadro 7), foram adicionados aos poços e as placas foram reincubadas por mais 24 h.

Após o período de incubação das cepas na forma planctônica e nas formas de biofilme em formação e de biofilme maduro, os sobrenadantes foram coletados e centrifugados a 12.000 rpm, por 10 min. Em seguida, alíquotas do sobrenadante foram coletadas e processadas para a avaliação da produção de proteases e de sideróforos.

Quanto à produção de proteases, 200 µL de cada sobrenadante (planctônico, biofilme em formação e biofilme maduro) de cada cepa foram adicionados a 200 µL de uma solução de azoalbumina (0,3% diluída em uma solução de bicarbonato de sódio 1%) e, então, o volume final de 400 µL foi incubado em banho-maria, a 37 °C por 3 horas. Decorrido esse tempo, a reação enzimática foi parada com a adição de 4 mL de ácido tricloroacético a 5%. Alíquotas de 2 mL foram centrifugadas a 10.000 rpm por 10 minutos e 100 µL do sobrenadante foram retirados e adicionados a 100 µL de uma solução de NaOH a 0,5 M. Após agitação em vórtex por 30 segundos, a solução foi lida em espectrofotômetro a 490 nm. O resultado foi apresentado como a diferença entre a densidade óptica das amostras teste e a densidade óptica da amostra branco (ALI, VIDHALE, 2011; WONGTRAKOONGATE et al., 2012). Os controles negativos e o branco (com ou sem compostos reguladores) do espectrofotômetro foram realizados da mesma maneira que os testes, porém sem inoculação do microrganismo. Os experimentos foram realizados em triplicata, em dois momentos distintos.

Para análise da produção de sideróforos, 100 µL do sobrenadante do crescimento foram adicionados ao mesmo volume de solução CAS (0,6 mM de hexadecil-trimetil-amônio, 0,015 mM de FeCl₃.6H₂O, 0,15 mM de Chrome Azural S, 50 mM de piperazina anidra, 0,75 M de HCl). Essa mistura foi incubada a 28 °C, durante 15 minutos, e, em seguida, submetida a espectrofotometria a 630 nm, para mensurar um aumento na intensidade da cor laranja, que significa uma maior atividade de sideróforos. O resultado foi apresentado como a diferença entre a densidade óptica da amostra teste e a densidade óptica da amostra branco (ALI, VIDHALE, 2011; WONGTRAKOONGATE et al., 2012). Os controles negativos e o branco (com ou sem compostos reguladores) do espectrofotômetro foram realizados da mesma maneira que os testes, porém sem inoculação do microrganismo. Os experimentos foram realizados em triplicata, em dois momentos distintos.

5.3.5 Análise estrutural dos biofilmes de *B. pseudomallei* expostos aos compostos reguladores de biofilmes

Para as análises no microscópio confocal de varredura a laser confocal (CLSM) foi escolhida uma cepa clínica representativa, forte formadora de biofilmes

(CEMM-Bp16) para avaliar os efeitos dos compostos reguladores sobre a estrutura de biofilmes em formação e maduros. Os biofilmes foram cultivados em uma placa de poliestireno de 24 poços contendo uma lamínula para Thermanox™ (Thermo Fisher Scientific, Nova York, NY) no fundo do poço, para a adesão do biofilme. A formação de biofilme foi induzida, utilizando os mesmos princípios metodológicos descritos anteriormente, i.e., caldo BHI-glicose 1%, inóculo bacteriano com concentração de $1,8 \times 10^9$ UFC/mL e proporção caldo: inóculo de 7:1, fazendo-se um ajuste volumétrico para 1000 μ L (875 μ L de meio e 125 μ L de inóculo). Para biofilmes em formação, os compostos reguladores de biofilmes foram incorporados ao meio, no momento da indução de crescimento de biofilmes, nas concentrações descritas no (Quadro 7). Para biofilmes maduros, a formação dos biofilmes foi induzida na ausência dos compostos reguladores, conforme descrito anteriormente. Após 48 h de crescimento, os biofilmes foram lavados com PBS, em seguida 1000 μ L de caldo BHI-glicose 1%, contendo os compostos reguladores nas concentrações descritas no (Quadro 7), foram adicionados aos poços e as placas foram re-incubadas por mais 24h.

Quadro 7. Concentrações dos compostos reguladores de biofilmes utilizadas para a análise estrutural de biofilmes em formação e de biofilmes maduros de *B. pseudomallei*.

Compostos reguladores	Biofilme em formação	Biofilme maduro
Ramnolipídio	78 μ g/mL	78 e 780 μ g/mL
CCCP	128 μ M	128 e 512 μ M
Curcumina	51,2 μ M	51,2 e 512 μ M
Furaneol	500 μ M	500 e 5000 μ M
8HSL	0,78 μ M	78 μ M

CCCP: Carbonil cianeto m-clorofenil-hidrazona

8HSL: Octanoil-homoserina-lactona

Após o período de incubação, tanto para biofilmes em formação quanto para biofilmes maduros, os poços foram lavados com PBS e a Thermanox foi transferida para uma placa de Petri com de lamínula, contendo 200 μ L de corante fluorescente Live / Dead (Invitrogen™, EUA) (200 μ L). Posteriormente, os biofilmes foram avaliados (10 campos) sob um microscópio confocal Nikon C2, com o aumento de

600x, usando laser a 488 nm para a detecção do corante fluorescente SYTO9, que identifica células bacterianas vivas, e a 561 nm para a detecção do iodeto de propídio, que identifica células bacterianas mortas / danificadas. As imagens foram analisadas com o software COMSTAT™ e os parâmetros biomassa, espessura média da biomassa, espessura de toda a área, coeficiente de rugosidade e razão área-volume foram calculados. Lâminas contendo biofilmes não expostos aos compostos reguladores de biofilmes foram analisadas e consideradas como controle de crescimento.

5.4 Análise estatística

Os dados foram, inicialmente, analisados quanto à simetria. Para avaliar os dados paramétricos, foram utilizados os testes T para amostras pareadas e não pareadas e a análise de variância (ANOVA) para avaliar o efeito dos compostos reguladores de biofilmes sobre a sensibilidade antimicrobiana, a formação de biofilmes e os biofilmes maduros. Quanto aos dados com distribuição assimétrica, foram utilizados os testes de Wilcoxon para amostras pareadas, de Mann-Whitney para amostras não pareadas e ANOVA seguida do teste posthoc de Kruskal-Wallis. As análises foram realizadas e os gráficos gerados pelo software GraphPad Prism, versão 7,1. Para todos os testes aplicados, valores de $P < 0,05$ permitiram tirar conclusões significativas.

Resultados

6. RESULTADOS

1ª PARTE EXPERIMENTAL

6.1 Sensibilidade de *B. pseudomallei* na forma planctônica e de biofilme aos compostos reguladores de biofilmes e às drogas antimicrobianas

Quanto à sensibilidade planctônica, observou-se que o ramnolipídio não inibiu o crescimento bacteriano em nenhuma das concentrações testadas (9,76–5000 µg/mL). Entretanto, a partir de 78 µg/mL, foram observadas alterações no padrão de crescimento microbiano, o qual se apresentou aspecto granuloso e heterogêneo. Portanto, essa concentração foi utilizada como a maior concentração utilizada contra biofilmes em formação. O CCCP apresentou CIMs variando de 32 a 128 µM e a concentração de 128 µM foi escolhida como a maior concentração utilizada nos ensaios com biofilmes em formação. Quanto à curcumina, ao furaneol e à 8HSL, nenhuma das concentrações testadas inibiu ou alterou o padrão de crescimento planctônico de *B. pseudomallei*. Assim, as maiores concentrações testadas desses compostos foram utilizadas nos ensaios com os biofilmes.

No tocante aos antimicrobianos, as CIMs variaram de 0,25 a 1 (média geométrica-GM=0,59) µg/mL para DOX; de 2 a 16 (GM=2,28) µg/mL para MER; de 0,25 a 2 (GM=0,52) µg/mL para CAZ; de 1/0,5 a 4/2 (2,95/1,48) µg/mL para AMC; de 0,25/4,75 a 4/76 (GM=0,96/18,19) µg/mL para TSX (Tabela 2).

Quanto à sensibilidade dos biofilmes, somente o CCCP inibiu os biofilmes maduros na concentração de 4.250-1.062 µM. Os demais compostos não apresentaram CEMBs no intervalo de concentrações testado.

Em relação aos antimicrobianos, os intervalos de CEMBs foram de 2-32 (GM=19,03) µg/mL para DOX; 2-32 (GM=26,91) µg/mL para MER; 16-32 (GM=29,34) µg/mL para CAZ; 64/32-256/128 (215,3/107,6) µg/mL para AMC e 4/76-32/608 (17,45/331,5) µg/mL para TSX (Tabela 2). No geral, os valores de CEMB obtidos para todas as drogas testadas foram significativamente maiores ($P < 0,05$) do que os valores de CIM, demonstrando que os biofilmes de *B. pseudomallei* toleram concentrações antimicrobianas mais altas que seus equivalentes planctônicos.

6.1.2 Sensibilidade de *B. pseudomallei* na forma planctônica e de biofilme às drogas antimicrobianas combinadas com os compostos reguladores de biofilmes

O ramnolípídeo (78 µg/mL) reduziu significativamente ($P \leq 0,01$) a CIM para MER, CAZ e TSX, que apresentaram intervalos de CIM de 0,5-1 (GM=0,71) µg/mL, 0,0625-0,5 (GM=0,19) µg/mL e 0,5/9,5-1/19 (GM=0,68/12,87) µg/mL, respectivamente, enquanto aumentou significativamente ($P < 0,01$) a CIM de AMC, que foi de 32/16 (GM=32/16) µg/mL contra todas as cepas testadas (Tabela 2). Quanto às CEMBs, o ramnolípídeo (78 µg/mL) reduziu significativamente ($P < 0,05$) as CEMBs para MER e AMC, apresentando intervalos variando de 0,5-32 (GM=11,81) µg/mL e 16/8-256/128 (GM=133,7/66,85) µg/mL, respectivamente (Tabela 2).

Table 2. Concentrações inibitórias mínimas (CIMs) e concentrações eliminatória mínimas do biofilme (CEMBs) de antibacterianos isolados ou combinados com ramnolipídio contra crescimento planctônico e biofilmes de *Burkholderia pseudomallei* clínica e ambiental.

Cepas	Fonte	Doxyciclina (µg/mL)				Meropenem (µg/mL)				Ceftazidima (µg/mL)				Amoxiciclina-clavulanato (µg/mL)				Trimetoprim- Sulfametaxazol (µg/mL)			
		Isolado		Ramnolipídeo (75 µg/mL)		Isolado		Ramnolipídeo (75 µg/mL)		Isolado		Ramnolipídeo (75 µg/mL)		Isolado		Ramnolipídeo (75 µg/mL)		Isolado		Ramnolipídeo (75 µg/mL)	
		CIM	CEMB	CIM	CEMB	CIM	CEMB	CIM	CEMB	CIM	CEMB	CIM	CEMB	CIM	CEMB	CIM	CEMB	CIM	CEMB	CIM	CEMB
39	ENV	0.5	32	0.5	32	2	32	0.5	8	0.25	32	0.125	32	4/2	256/128	32/16	256/128	1/19	32/608	0.5/9.5	32/608
40	ENV	0.5	32	0.5	32	2	32	0.5	32	0.5	32	0.125	32	4/2	256/128	32/16	256/128	0.25/4.75	32/608	0.5/9.5	32/608
41	ENV	0.25	32	0.5	32	2	32	0.5	32	0.25	32	0.125	4	2/1	256/128	32/16	16/8	2/38	32/608	1/19	8/152
42	ENV	0.5	32	0.125	8	2	32	0.5	2	0.5	32	0.125	32	2/1	256/128	32/16	256/128	0.25/4.75	32/608	1/19	16/304
43	ENV	0.5	32	0.5	32	2	32	0.5	32	0.25	32	0.125	32	2/1	256/128	32/16	64/32	4/76	32/608	1/19	16/304
46	ENV	0.5	2	0.5	32	2	32	0.5	32	0.5	32	0.0625	16	2/1	256/128	32/16	256/128	2/38	32/608	1/19	32/608
47	ENV	0.5	2	0.5	32	2	32	0.5	8	0.5	32	0.125	16	1/0.5	256/128	32/16	128/64	2/38	32/608	1/19	8/152
48	ENV	1	32	0.5	32	2	32	0.5	32	0.5	32	0.125	32	4/2	64/32	32/16	64/32	0.5/9.5	32/608	1/19	32/608
PB-2	CLIN	0.5	32	1	8	2	32	1	32	0.5	32	0.5	32	4/2	256/128	32/16	128/64	1/19	8/152	0.5/9.5	16/304
PB-4	CLIN	1	32	0.5	16	2	32	1	32	0.5	32	0.5	32	4/2	256/128	32/16	256/128	0.5/9.5	8/152	0.5/9.5	8/152
BP-6	CLIN	0.5	16	0.5	8	2	32	1	4	1	32	0.5	16	4/2	256/128	32/16	256/128	0.5/9.5	8/152	0.5/9.5	16/304
BP-14	CLIN	1	16	0.5	2	2	32	1	0.5	0.5	32	0.25	32	4/2	256/128	32/16	256/128	2/38	16/304	1/19	32/608
BP-16	CLIN	0.5	32	0.5	32	2	32	1	32	0.5	32	0.25	16	4/2	256/128	32/16	256/128	0.25/4.75	16/304	0.5/9.5	32/608
BP-18	CLIN	1	8	0.5	32	2	2	1	0.5	1	32	0.25	32	4/2	256/128	32/16	128/64	2/38	8/152	0.5/9.5	16/304
BP-19	CLIN	1	32	0.5	16	16	32	1	32	2	16	0.25	16	2/1	256/128	32/16	256/128	1/19	16/304	0.5/9.5	32/608
BP-20	CLIN	0.5	32	0.5	16	2	32	1	32	0.5	16	0.25	16	4/2	64/32	32/16	16/8	2/38	4/76	0.5/9.5	4/76
Média geométrica		0.59	19.03	0.48	18.22	2.28	26.91	0.71*	11.81†	0.52	29.34	0.19*	21.67	2.95/1.48	215.27/107.6	32/16*	133.67/66.85†	0.96/18.19	17.45/331.5	0.68/12.87*	17.45/331.5
Desvio padrão		0.26	11.68	0.16	11.52	3.5	7.5	0.26	14.23	0.43	5.46	0.15	9.52	1.11/0.55	65.58/32.79	0/0	96.86/48.43	1.02/19.45	11.57/219.8	0.26/4.87	10.85/206.2

ENV: Cepas ambientais; CLIN: Cepas clínicas. * indica diferenças estatisticamente significativas entre as CIM de antibacterianas isoladas e combinadas com o ramnolipídio. † indica diferenças estatisticamente significativas entre os CEMBs de antibacterianos isolados e combinados com o ramnolipídio.

Quanto ao CCCP (128 μ M), foram observadas reduções significativas ($P < 0,01$) nas CIMs de MER, CAZ e TSX, que apresentaram intervalos de CIM de 0,03125-0,5 (GM=0,16) μ g/mL, 0,125-0,25 (GM=0,13) μ g/mL e 0,5/9,5-1/19 (GM=0,59/11,21) μ g/mL, respectivamente, enquanto aumentou significativamente ($P < 0,01$) as CIMs de AMC que variaram de 16/8-32/16 (GM=29,3/14,6) μ g/mL (Tabela 3).

Ademais, o CCCP (128 μ M) reduziu significativamente ($P < 0,05$) as CEMBs para DOX, MER, CAZ, AMC e TSX que apresentaram intervalos de CEMB de 0,5-2 (GM=0,54) μ g/mL, 8-16 (GM=8,35) μ g/mL, 0,125-0,5 (GM=0,27) μ g/mL, 64/32-128/64 (GM = 69,79/34,89) μ g/mL e 2/38-32/608 (GM= 7,66/145,54) μ g/mL respectivamente (Tabela 3).

Tabela 3. Concentrações inibitórias mínimas (CIMs) e concentrações eliminatória mínimas do biofilme (CEMBs) de antibacterianos isolados ou combinados com CCCP contra crescimento planctônico e biofilmes de *Burkholderia pseudomallei* clínica e ambiental.

Cepas	Fonte	Doxyciclina (µg/mL)				Meropenem (µg/mL)				Ceftazidima (µg/mL)				Amoxiciclina-clavulanato (µg/mL)				Trimetoprim- Sulfametaxazol (µg/mL)			
		Isolado		CCCP (128 µM)		Isolado		CCCP (128 µM)		Isolado		CCCP (128 µM)		Isolado		CCCP (128 µM)		Isolado		CCCP (128 µM)	
		CIM	CEMB	CIM	CEMB	CIM	CEMB	CIM	CEMB	CIM	CEMB	CIM	CEMB	CIM	CEMB	CIM	CEMB	CIM	CEMB	CIM	CEMB
39	ENV	0.5	32	0.5	32	2	32	0.031	16	0.25	32	0.25	32	4/2	256/128	32/16	128/64	1/19	32/608	0.5/9.5	32/608
40	ENV	0.5	32	0.5	32	2	32	0.062	8	0.5	32	0.125	32	4/2	256/128	32/16	128/64	0.25/4.75	32/608	0.5/9.5	8/152
41	ENV	0.25	32	0.5	32	2	32	0.062	8	0.25	32	0.125	4	2/1	256/128	32/16	64/32	2/38	32/608	0.5/9.5	4/76
42	ENV	0.5	32	0.125	32	2	32	0.062	8	0.5	32	0.125	32	2/1	256/128	32/16	64/32	0.25/4.75	32/608	0.5/9.5	4/76
43	ENV	0.5	32	0.5	32	2	32	0.062	8	0.25	32	0.125	32	2/1	256/128	16/8	64/32	4/76	32/608	0.5/9.5	8/152
46	ENV	0.5	2	0.5	2	2	32	0.062	8	0.5	32	0.125	16	2/1	256/128	32/16	64/32	2/38	32/608	0.5/9.5	8/152
47	ENV	0.5	2	0.5	2	2	32	0.062	8	0.5	32	0.125	16	1/0.5	256/128	32/16	64/32	2/38	32/608	0.5/9.5	32/608
48	ENV	1	32	0.5	1	2	32	0.062	8	0.5	32	0.125	32	4/2	64/32	32/16	64/32	0.5/9.5	32/608	0.5/9.5	4/76
PB-2	CLIN	0.5	32	1	32	2	32	0.5	8	0.5	32	0.125	32	4/2	256/128	16/8	64/32	1/19	8/152	1/19	4/76
PB-4	CLIN	1	32	0.5	32	2	32	0.5	8	0.5	32	0.125	32	4/2	256/128	32/16	64/32	0.5/9.5	8/152	1/19	2/38
BP-6	CLIN	0.5	16	0.5	16	2	32	0.5	8	1	32	0.125	16	4/2	256/128	32/16	64/32	0.5/9.5	8/152	1/19	32/608
BP-14	CLIN	1	16	0.5	16	2	32	0.5	8	0.5	32	0.125	32	4/2	256/128	32/16	64/32	2/38	16/304	1/19	4/76
BP-16	CLIN	0.5	32	0.5	8	2	32	0.5	8	0.5	32	0.125	16	4/2	256/128	32/16	64/32	0.25/4.75	16/304	0.5/9.5	2/38
BP-18	CLIN	1	8	0.5	32	2	2	0.25	8	1	32	0.125	32	4/2	256/128	32/16	64/32	2/38	8/152	0.5/9.5	8/152
BP-19	CLIN	1	32	1	32	16	32	0.5	8	2	16	0.125	16	2/1	256/128	32/16	64/32	1/19	16/304	0.5/9.5	8/152
BP-20	CLIN	0.5	32	0.5	16	2	32	0.5	8	0.5	16	0.125	16	4/2	64/32	32/16	64/32	2/38	4/76	0.5/9.5	8/152
Média geométrica		0.59	19.03	0.5	11.81†	2.28	26.91	0.16*	8.35†	0.52	29.34	0.13*	21.67†	2.95/1.48	215.27/107.6	29/14*	69.79/39.89†	0.96/18.19	17.45/331.5	0.47/10.06*	7.66/142.8†
Desvio padrão		0.26	11.68	0.20	13.78	3.5	7.5	0.25	2	0.43	5.46	12.64	9.52	1.11/0.55	65.58/32.79	5.4/2.7	21.86/10.93	1.02/19.45	11.57/219.8	0.22/4.25	10.68/202.9

ENV: Cepas ambientais; CLIN: Cepas clínicas. * indica diferenças estatisticamente significativas entre as CIM de antibacterianas isoladas e combinadas com o CCCP. † indica diferenças estatisticamente significativas entre os CEMBs de antibacterianos isolados e combinados com o CCCP.

Quando a curcumina (51,2 μM) foi combinada com drogas antibacterianas observaram-se reduções significativas ($P < 0,01$) da CIM para DOX, MER e CAZ, que apresentaram intervalos de CIM de 0,0625-0,25 (GM = 0,13) $\mu\text{g/mL}$, 0,125-0,25 (GM= 0,14) $\mu\text{g/mL}$ e 0,0625-0,125 (GM= 0,06) respectivamente. Por outro lado, observou-se que a curcumina aumentou significativamente ($P < 0,01$) a CIM de AMC e de TSX, com concentrações de 16/8 (GM=16/08) $\mu\text{g/mL}$ e de 0,0625/1,19-4/76 (GM=1/19) $\mu\text{g/mL}$ (Tabela 4).

Quanto aos efeitos da curcumina sobre a sensibilidade antimicrobiana de biofilmes de *B. pseudomallei*, não foram observadas alterações significativas nos valores de CEMBs dos antimicrobianos, quando comparados àqueles observados para as drogas isoladas (Tabela 4).

Tabela 4. Concentrações inibitórias mínimas (CIMs) e concentrações eliminatória mínimas do biofilme (CEMBs) de antibacterianos isolados ou combinados com curcumina contra crescimento planctônico e biofilmes de *Burkholderia pseudomallei* clínica e ambiental.

Cepas	Fonte	Doxyciclina (µg/mL)				Meropenem (µg/mL)				Ceftazidima (µg/mL)				Amoxiciclina-clavulanato (µg/mL)				Trimetoprim- Sulfametaxazol (µg/mL)			
		Isolado		Curcumina (51.2 µM)		Isolado		Curcumina (51.2 µM)		Isolado		Curcumina (51.2 µM)		Isolado		Curcumina (51.2 µM)		Isolado		Curcumina (51.2 µM)	
		CIM	CEMB	CIM	CEMB	CIM	CEMB	CIM	CEMB	CIM	CEMB	CIM	CEMB	CIM	CEMB	CIM	CEMB	CIM	CEMB	CIM	CEMB
39	ENV	0.5	32	0.25	16	2	32	0.25	32	0.25	32	0.0625	16	4/2	256/128	16/8	64/32	1/19	32/608	4/76	8/152
40	ENV	0.5	32	0.25	16	2	32	0.25	32	0.5	32	0.125	32	4/2	256/128	16/8	256/128	0.25/4.75	32/608	4/76	16/304
41	ENV	0.25	32	0.25	16	2	32	0.125	16	0.25	32	0.0625	32	2/1	256/128	16/8	128/64	2/38	32/608	4/76	16/304
42	ENV	0.5	32	0.25	16	2	32	0.125	32	0.5	32	0.0625	32	2/1	256/128	16/8	256/128	0.25/4.75	32/608	4/76	16/304
43	ENV	0.5	32	0.25	16	2	32	0.125	32	0.25	32	0.0625	32	2/1	256/128	16/8	256/128	4/76	32/608	4/76	16/304
46	ENV	0.5	2	0.25	16	2	32	0.125	32	0.5	32	0.0625	32	2/1	256/128	16/8	256/128	2/38	32/608	4/76	16/304
47	ENV	0.5	2	0.25	16	2	32	0.125	16	0.5	32	0.0625	32	1/0.5	256/128	16/8	128/64	2/38	32/608	4/76	16/304
48	ENV	1	32	0.25	16	2	32	0.125	16	0.5	32	0.0625	32	4/2	64/32	16/8	128/64	0.5/9.5	32/608	4/76	16/304
PB-2	CLIN	0.5	32	0.0625	32	2	32	0.125	32	0.5	32	0.0625	32	4/2	256/128	16/8	256/128	1/19	8/152	0.25/4.75	32/608
PB-4	CLIN	1	32	0.0625	32	2	32	0.125	32	0.5	32	0.0625	32	4/2	256/128	16/8	128/64	0.5/9.5	8/152	0.0625/1.	8/152
BP-6	CLIN	0.5	16	0.0625	32	2	32	0.125	32	1	32	0.0625	32	4/2	256/128	16/8	128/64	0.5/9.5	8/152	0.0625/1.	16/304
BP-14	CLIN	1	16	0.0625	32	2	32	0.125	32	0.5	32	0.0625	32	4/2	256/128	16/8	256/128	2/38	16/304	0.0625/1.	16/304
BP-16	CLIN	0.5	32	0.0625	32	2	32	0.125	32	0.5	32	0.0625	32	4/2	256/128	16/8	256/128	0.25/4.75	16/304	0.25/4.75	16/304
BP-18	CLIN	1	8	0.0625	16	2	2	0.125	32	1	32	0.0625	32	4/2	256/128	16/8	256/128	2/38	8/152	0.25/4.75	16/304
BP-19	CLIN	1	32	0.125	32	16	32	0.125	32	2	16	0.0625	32	2/1	256/128	16/8	256/128	1/19	16/304	2/38	32/608
BP-20	CLIN	0.5	32	0.065	4	2	32	0.125	16	0.5	16	0.0625	32	4/2	64/32	16/8	128/64	2/38	4/76	2/38	16/304
Média geométrica		0.59	19.03	0.13*	19.02	2.28	26.91	0.13*	26.90	0.52	29.34	0.06*	30.64	2.95/1.48	215.27/107.6	16/8*	212.52/103.51	0.96/18.19	17.45/331.5	1/19*	16.71/317.4
Desvio padrão		0.26	11.68	0.09	9.08	3.5	7.5	0.04	7.15	0.43	5.46	0.01	4	1.11/0.55	65.58/32.79	0/0	62.68/30.95	1.02/19.45	11.57/219.8	1.84/35.01	6/114

ENV: Cepas ambientais; CLIN: Cepas clínicas. * indica diferenças estatisticamente significativas entre as CIM de antibacterianas isoladas e combinadas com o curcumina. † indica diferenças estatisticamente significativas entre os CEMBs de antibacterianos isolados e combinados com o curcumina.

Quando o furaneol (500 μM) foi combinado com drogas antibacterianas e testado contra *B. pseudomallei* na forma planctônica, observaram-se reduções significativas ($P < 0,01$) nas CIMs de DOX, MER e CAZ, cujos intervalos foram de 0,0625-0,5 (GM=0,12) $\mu\text{g/mL}$, 0,03125-0,25 (GM=0,14) $\mu\text{g/mL}$, 0,0625-0,125 (GM=0,09) respectivamente. Por outro lado, o furaneol causou aumentos significativos ($P < 0,01$) nas CIMs de AMC e de TSX, as quais variaram de 16/8-32/16 (GM=30,64/15,32) (Tabela 5) e de 0,125/2,37-4/76 (GM=1,19).

Quanto à sensibilidade dos biofilmes, o furaneol (500 μM) induziu a redução significativa ($P < 0,05$) dos valores de CEMB de MER e AMC que apresentaram intervalos de CEMB de 16-32 (GM=17,45) e de 32/16-256/128 (GM=122,6/61,3) $\mu\text{g/mL}$ respectivamente (Tabela 5).

Tabela 5. Concentrações inibitórias mínimas (CIMs) e concentrações eliminatória mínimas do biofilme (CEMBs) de antibacterianos isolados ou combinados com furaneol contra crescimento planctônico e biofilmes de *Burkholderia pseudomallei* clínica e ambiental.

Cepas	Fonte	Doxyciclina (µg/mL)				Meropenem (µg/mL)				Ceftazidima (µg/mL)				Amoxiciclina-clavulanato (µg/mL)				Trimetoprim- Sulfametaxazol (µg/mL)			
		Isolado		Furaneol (500 µM)		Isolado		Furaneol (500 µM)		Isolado		Furaneol (500 µM)		Isolado		Furaneol (500 µM)		Isolado		Furaneol (500 µM)	
		CIM	CEMB	CIM	CEMB	CIM	CEMB	CIM	CEMB	CIM	CEMB	CIM	CEMB	CIM	CEMB	CIM	CEMB	CIM	CEMB	CIM	CEMB
39	ENV	0.5	32	0.125	16	2	32	0.25	8	0.25	32	0.125	32	4/2	256/128	32/16	128/64	1/19	32/608	4/76	16/304
40	ENV	0.5	32	0.25	16	2	32	0.25	32	0.5	32	0.0625	32	4/2	256/128	32/16	128/64	0.25/4.75	32/608	4/76	32/608
41	ENV	0.25	32	0.25	16	2	32	0.125	32	0.25	32	0.125	32	2/1	256/128	32/16	128/64	2/38	32/608	4/76	32/608
42	ENV	0.5	32	0.25	32	2	32	0.125	2	0.5	32	0.125	32	2/1	256/128	32/16	128/64	0.25/4.75	32/608	4/76	16/304
43	ENV	0.5	32	0.5	16	2	32	0.125	32	0.25	32	0.125	32	2/1	256/128	32/16	128/64	4/76	32/608	4/76	16/304
46	ENV	0.5	2	0.125	32	2	32	0.125	32	0.5	32	0.125	32	2/1	256/128	32/16	128/64	2/38	32/608	4/76	32/608
47	ENV	0.5	2	0.125	32	2	32	0.125	8	0.5	32	0.125	32	1/0.5	256/128	32/16	256/128	2/38	32/608	4/76	32/608
48	ENV	1	32	0.0625	16	2	32	0.125	32	0.5	32	0.125	32	4/2	64/32	32/16	32/16	0.5/9.5	32/608	4/76	32/608
PB-2	CLIN	0.5	32	0.0625	16	2	32	0.125	32	0.5	32	0.0625	32	4/2	256/128	32/16	128/64	1/19	8/152	0.125/2.3	16/304
PB-4	CLIN	1	32	0.0625	16	2	32	0.125	32	0.5	32	0.0625	32	4/2	256/128	32/16	128/64	0.5/9.5	8/152	0.125/2.3	16/304
BP-6	CLIN	0.5	16	0.0625	32	2	32	0.125	4	1	32	0.0625	32	4/2	256/128	32/16	128/64	0.5/9.5	8/152	0.125/2.3	32/608
BP-14	CLIN	1	16	0.0625	32	2	32	0.125	0.5	0.5	32	0.0625	32	4/2	256/128	32/16	128/64	2/38	16/304	0.25/4.75	32/608
BP-16	CLIN	0.5	32	0.0625	32	2	32	0.125	32	0.5	32	0.0625	32	4/2	256/128	32/16	128/64	0.25/4.75	16/304	0.25/4.75	32/608
BP-18	CLIN	1	8	0.0625	16	2	2	0.125	0.5	1	32	0.0625	32	4/2	256/128	32/16	128/64	2/38	8/152	4/76	32/608
BP-19	CLIN	1	32	0.125	16	16	32	0.25	32	2	16	0.125	32	2/1	256/128	16/8	128/64	1/19	16/304	1/19	32/608
BP-20	CLIN	0.5	32	0.125	16	2	32	0.25	32	0.5	16	0.0625	32	4/2	64/32	32/16	128/64	2/38	4/76	4/76	16/304
Média geométrica		0.59	19.03	0.11*	20.74	2.28	26.91	0.13*	11.81†	0.52	29.34	0.08*	29.34	2.95/1.48	215.27/107.6	30.64/15.32*	122.88/61.28†	0.96/18.19	17.45/331.5	2.78/20.91*	24.67/468.8
Desvio padrão		0.26	11.68	0.11	8	3.5	7.5	0.26	14.23	0.43	5.46	0.03	5.46	1.11/0.55	65.58/32.79	4/2	39.95/20.63	1.02/19.45	11.57/219.8	49.7/35.1	8.28/157.3

ENV: Cepas ambientais; CLIN: Cepas clínicas. * indica diferenças estatisticamente significativas entre as CIM de antibacterianas isoladas e combinadas com o furaneol. † indica diferenças estatisticamente significativas entre os CEMBs de antibacterianos isolados e combinados com o furaneol.

Quando a 8HSL (7,8 μ M) foi combinada com drogas antibacterianas, observaram-se reduções significativas ($P < 0,01$) da CIM para DOX, MER, CAZ e TSX que apresentaram intervalos de CIM de 0,0625-0,25 (GM=0,17) μ g/mL, 0,0625-0,25 (GM=0,19) μ g/mL, 0,03125-0,0625 (GM=0,06) e 0,0625/1,19-0,5/9,5 (GM=0,14/2,66) respectivamente, enquanto aumentou significativamente ($P < 0,01$) as CIMs de AMC, cujo intervalo foi de 4/2-8/4 (GM=7,66/3,83) (Tabela 6).

Ademais, a 8HSL (7,8 μ M) causou reduções significativas ($P < 0,05$) nas CEMBs de MER e AMC que apresentaram intervalos de CEMB de 16-32 (GM=18,22) μ g/mL, e de 128/64-256/128 (GM =145,8/72,9) μ g/mL, respectivamente (Tabela 6).

Tabela 6. Concentrações inibitórias mínimas (CIMs) e concentrações eliminatória mínimas do biofilme (CEMBs) de antibacterianos isolados ou combinados com 8HSL contra crescimento planctônico e biofilmes de *Burkholderia pseudomallei* clínica e ambiental.

Cepas	Fonte	Doxyciclina (µg/mL)				Meropenem (µg/mL)				Ceftazidima (µg/mL)				Amoxiciclina-clavulanato (µg/mL)				Trimetoprim- Sulfametaxazol (µg/mL)			
		Isolado		8HSL (7.8 µM)		Isolado		8HSL (7.8 µM)		Isolado		8HSL (7.8 µM)		Isolado		8HSL (7.8 µM)		Isolado		8HSL (7.8 µM)	
		CIM	CEMB	CIM	CEMB	CIM	CEMB	CIM	CEMB	CIM	CEMB	CIM	CEMB	CIM	CEMB	CIM	CEMB	CIM	CEMB	CIM	CEMB
39	ENV	0.5	32	0.25	16	2	32	0.125	16	0.25	32	0.0625	32	4/2	256/128	8/4	256/128	1/19	32/608	0.125/2.3	16/304
40	ENV	0.5	32	0.25	16	2	32	0.125	16	0.5	32	0.0625	32	4/2	256/128	8/4	256/128	0.25/4.75	32/608	0.125/2.3	16/304
41	ENV	0.25	32	0.25	16	2	32	0.25	16	0.25	32	0.0625	32	2/1	256/128	8/4	128/64	2/38	32/608	0.125/2.3	16/304
42	ENV	0.5	32	0.25	16	2	32	0.25	16	0.5	32	0.0625	32	2/1	256/128	4/2	128/64	0.25/4.75	32/608	0.125/2.3	32/608
43	ENV	0.5	32	0.25	16	2	32	0.25	16	0.25	32	0.0625	16	2/1	256/128	8/4	128/64	4/76	32/608	0.125/2.3	32/608
46	ENV	0.5	2	0.25	16	2	32	0.25	16	0.5	32	0.0625	32	2/1	256/128	8/4	128/64	2/38	32/608	0.125/2.3	16/304
47	ENV	0.5	2	0.25	32	2	32	0.25	16	0.5	32	0.0625	32	1/0.5	256/128	8/4	128/64	2/38	32/608	0.125/2.3	16/304
48	ENV	1	32	0.25	16	2	32	0.25	32	0.5	32	0.0625	16	4/2	64/32	8/4	128/64	0.5/9.5	32/608	0.125/2.3	16/304
PB-2	CLIN	0.5	32	0.125	16	2	32	0.25	32	0.5	32	0.0625	32	4/2	256/128	8/4	128/64	1/19	8/152	0.125/2.3	16/304
PB-4	CLIN	1	32	0.125	32	2	32	0.0625	32	0.5	32	0.0625	32	4/2	256/128	8/4	256/128	0.5/9.5	8/152	0.5/9.5	16/304
BP-6	CLIN	0.5	16	0.0625	32	2	32	0.125	16	1	32	0.0625	32	4/2	256/128	8/4	128/64	0.5/9.5	8/152	0.5/9.5	32/608
BP-14	CLIN	1	16	0.125	16	2	32	0.125	16	0.5	32	0.0625	32	4/2	256/128	8/4	128/64	2/38	16/304	0.125/2.3	16/304
BP-16	CLIN	0.5	32	0.125	16	2	32	0.25	16	0.5	32	0.0625	32	4/2	256/128	8/4	128/64	0.25/4.75	16/304	0.125/2.3	32/608
BP-18	CLIN	1	8	0.125	16	2	2	0.25	16	1	32	0.0625	32	4/2	256/128	8/4	128/64	2/38	8/152	0.125/2.3	16/304
BP-19	CLIN	1	32	0.125	16	16	32	0.25	16	2	16	0.0625	32	2/1	256/128	8/4	128/64	1/19	16/304	0.125/2.3	16/304
BP-20	CLIN	0.5	32	0.125	16	2	32	0.25	16	0.5	16	0.0625	32	4/2	64/32	8/4	128/64	2/38	4/76	0.125/2.3	16/304
Média geométrica		0.59	19.03	0.16*	18.22	2.28	26.91	0.19*	18.22†	0.52	29.34	0.06*	29.34	2.95/1.48	215.27/107.6	7.63/3*	156/80.63†	0.96/18.19	17.45/331.5	0.68/12.87*	19.24/304.5
Desvio padrão		0.26	11.68	0.07	6.44	3.5	7.5	0.06	6.44	0.43	5.46	0	5.46	1.11/0.55	65.58/32.79	1.03/0.51	0/55.42	1.02/19.45	11.57/219.8	0/0	7.32/142.51

ENV: Cepas ambientais; CLIN: Cepas clínicas. * indica diferenças estatisticamente significativas entre as CIM de antibacterianas isoladas e combinadas com o 8HSL. † indica diferenças estatisticamente significativas entre os CEMBs de antibacterianos isolados e combinados com o 8HSL.

2ª PARTE EXPERIMENTAL

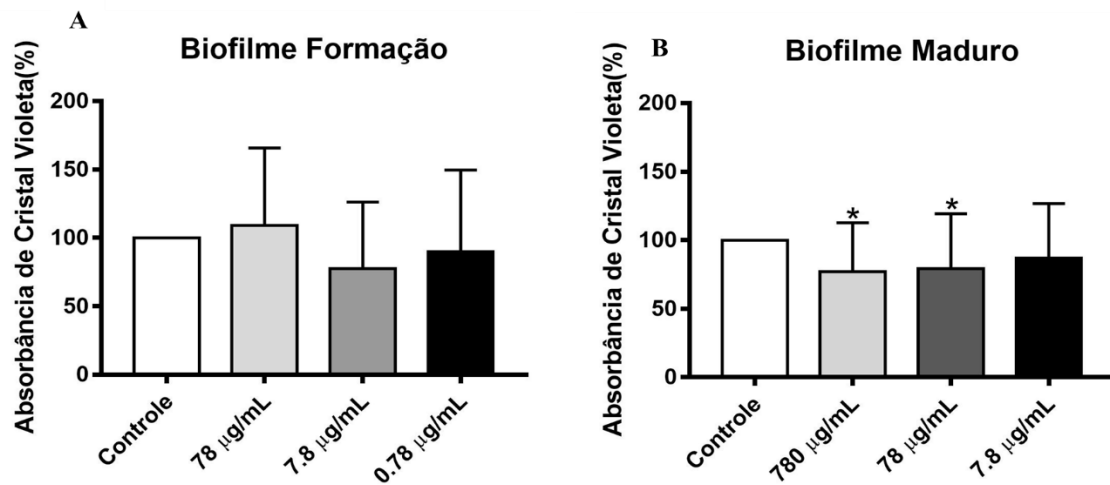
Na segunda etapa da presente pesquisa, buscou-se avaliar o efeito dos compostos reguladores de biofilmes sobre a produção de fatores de virulência, incluindo a formação e a manutenção de biofilmes e a produção de proteases e de sideróforos. Assim, os resultados serão apresentados para cada composto.

6.2 Ramnolipídio

Inicialmente foi avaliado o efeito do biossurfactante ramnolipídio sobre a formação de biofilmes e sobre biofilmes maduros. Para os biofilmes em formação, foram utilizadas as seguintes concentrações 0,78, 7,8 e 78 $\mu\text{g/mL}$, e observou-se que nenhuma concentração alterou significativamente a formação do biofilme, sendo observados os valores de absorvância pela coloração da biomassa com cristal violeta de $0,256 \pm 0,143$ para o controle, e de $0,229 \pm 0,140$, $0,198 \pm 0,097$ e $0,279 \pm 0,159$ para crescimento na presença de 0,78, 7,8 e 78 $\mu\text{g/mL}$ de ramnolipídio, respectivamente. Após essa etapa, foi avaliado o efeito do ramnolipídio sobre biofilmes maduros, com 48 horas de crescimento, utilizando as concentrações de 7,8, 78 e 780 $\mu\text{g/mL}$. Os valores de absorvância pela coloração da biomassa com cristal violeta foram de $0,278 \pm 0,132$ para o controle, e de $0,233 \pm 0,103$, $0,220 \pm 0,089$ e $0,215 \pm 0,076$, nas concentrações de 7,8, 78 e 780 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente, sendo observada uma redução estatisticamente significativa nas concentrações de 78 e 780 $\mu\text{g/mL}$ ($P < 0,05$) (Figura 11).

Na análise do biofilme por microscopia confocal utilizando Live/Dead, observamos que não houve a diferenças estatística entre a biomassa, espessura máxima e coeficiente de rugosidade (Figura 12), ademais, quando o ramnolipídio foi adicionado ao biofilme maduro, após 48h de crescimento, reduziu significativamente ($P < 0,05$) em ambas as concentrações testadas a biomassa do biofilme, espessura máxima, coeficiente de rugosidade e a espessura área volume. Ao analisar a intensidade da fluorescência pelo método do Ruby não foram observadas diferenças estatísticas entre o biofilme em formação e maduro (Figura 13)

Figura 11. Efeito do biossurfactante ramnolipídio sobre a formação de biofilme (A) e sobre o biofilme maduro (B) de *Burkholderia pseudomallei*.



* indica diferenças significativas ($P < 0,05$) na biomassa dos biofilmes de *B. pseudomallei*, após exposição ao ramnolipídio, quando comparado ao respectivo controle de crescimento, não exposto ao composto.

Figura 12. Análise da microscopia confocal do ramnolipídio em biofilmes em formação e maduro de *B. pseudomallei*.

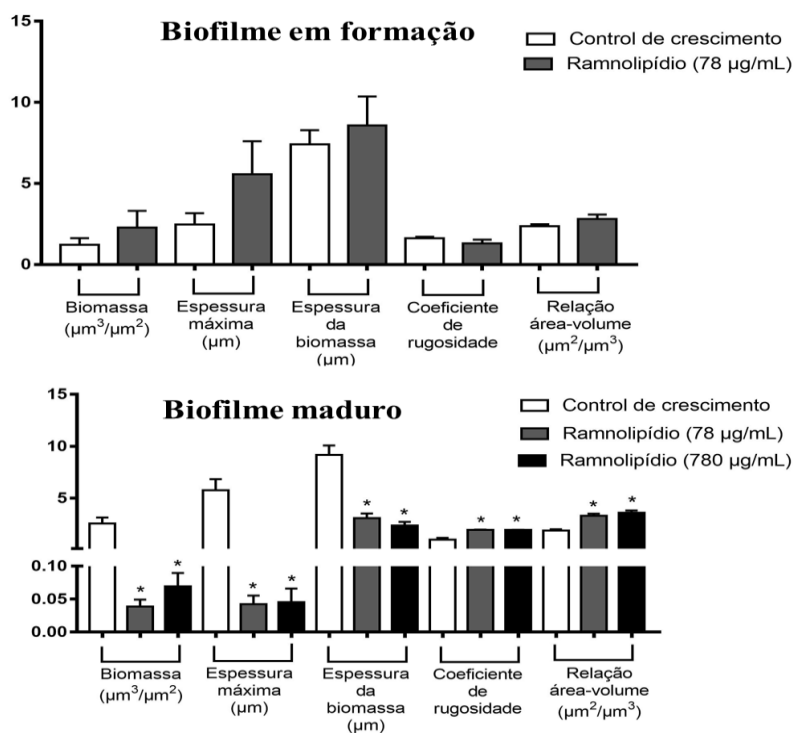
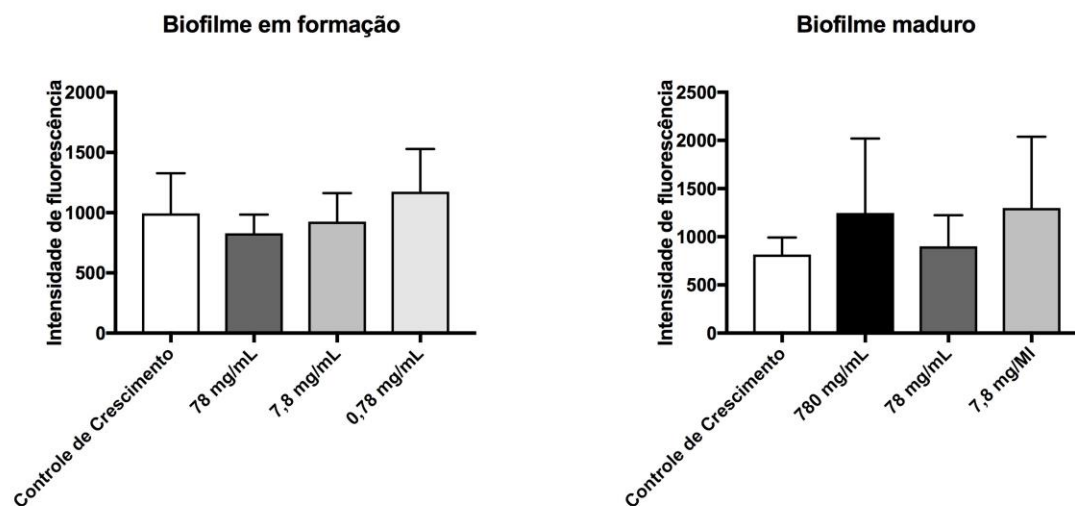
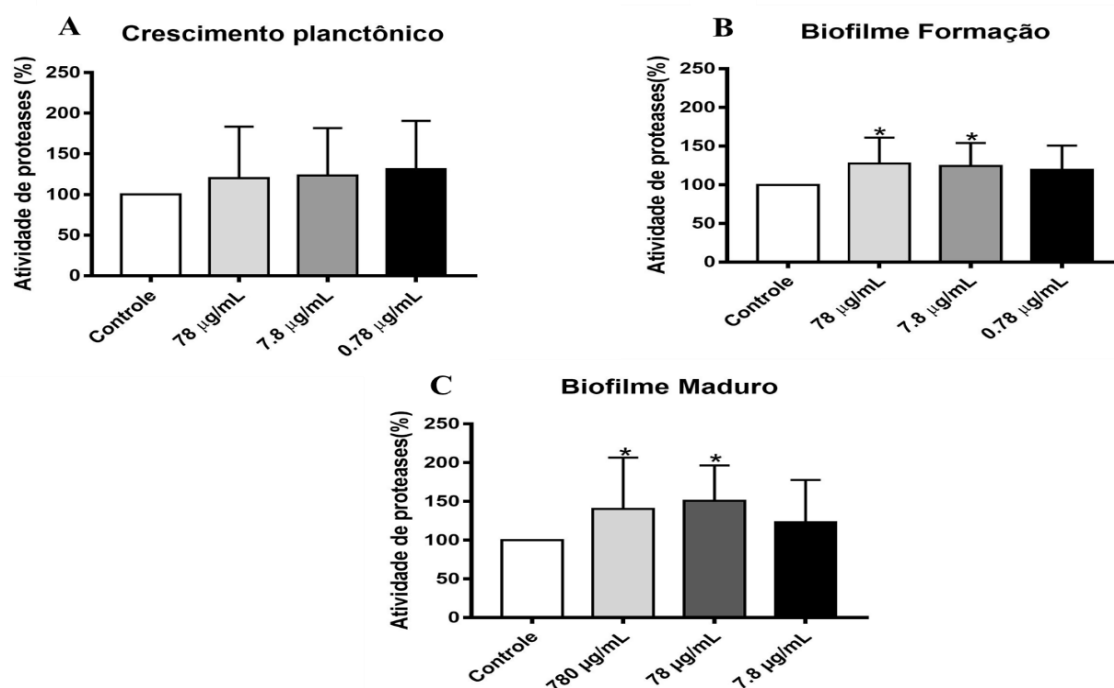


Figura 13. Detenção da biomassa pela fluorescência através do método de Ruby em biofilmes de *B. pseudomallei*.



Quanto à produção de proteases, o ramnolipídio não alterou a produção de proteases por *B. pseudomallei* na forma planctônica. Entretanto, observou-se um aumento na atividade enzimática dos biofilmes em formação, representando $118 \pm 36\%$, $117 \pm 28\%$ ($P < 0,05$) e $128 \pm 41\%$ ($P < 0,05$) daquela no controle de crescimento, quando estes foram formados na presença de 0,78, 7,8 e 78 $\mu\text{g/mL}$ de ramnolipídio, respectivamente (Figura 14). Quanto ao biofilme maduro, observou-se que a atividade enzimática representou $125 \pm 75\%$, $162 \pm 75\%$ ($P < 0,05$) e $150 \pm 100\%$ ($P < 0,05$) daquela do controle de crescimento, quando estes biofilmes foram expostos a 7,8, 78 e 780 $\mu\text{g/mL}$ de ramnolipídio, respectivamente (Figura 14).

Figura 14. Efeito do biossurfactante ramnolipídio sobre a produção de proteases por *Burkholderia pseudomallei* na planctônica (A), biofilme formação (B) e biofilme maduro (C).

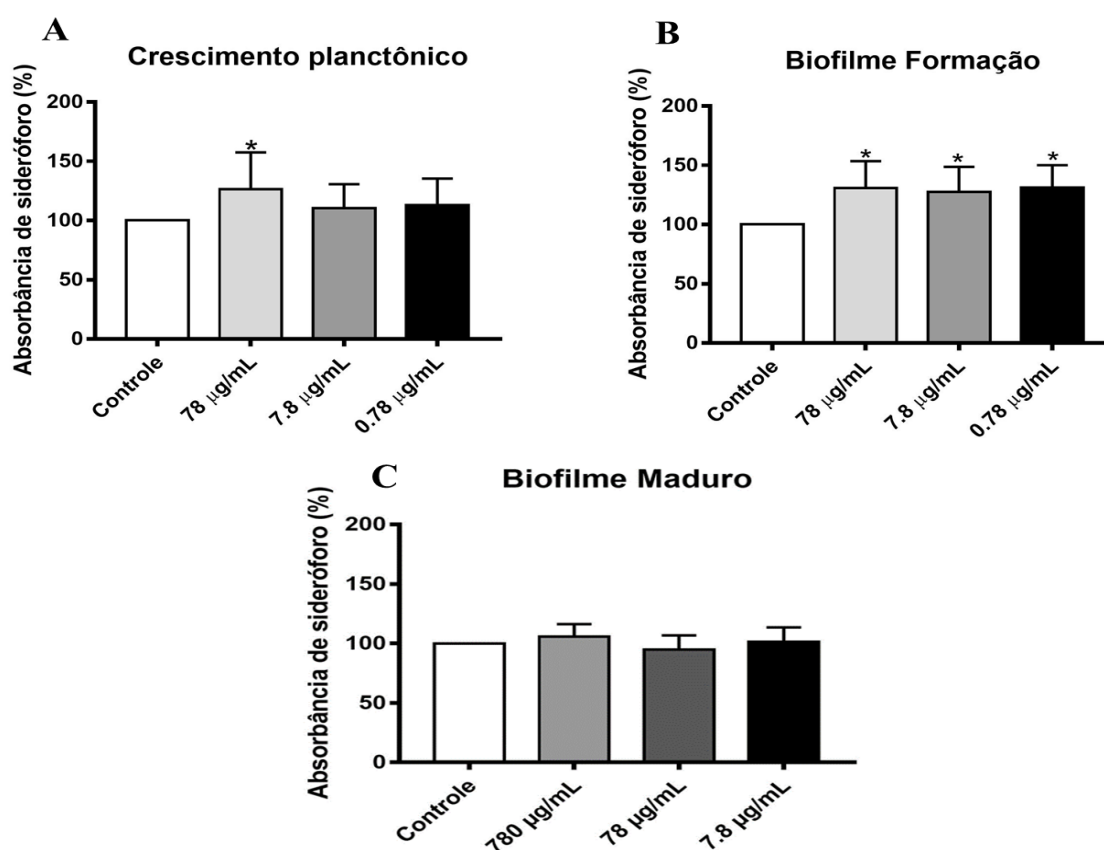


* indica diferenças significativas ($P < 0,05$) na atividade de proteases por *B. pseudomallei*, após exposição ao ramnolipídio, quando comparado ao respectivo controle de crescimento, não exposto ao composto.

A produção de sideróforos pelas células planctônicas de *B. pseudomallei* apresentou uma tendência ao aumento, apresentando 106 a 113% da produção pelas células planctônicas não expostas ao ramnolipídio, entretanto, diferenças

significativas ($P < 0,05$) foram observadas somente após a exposição à maior concentração do biossurfactante (Figura 15/A). Quanto aos biofilmes em formação, observou-se um aumento significativo ($P < 0,05$) na produção de sideróforos, na presença das três concentrações de ramnolipídio, variando de 127 a 131% da produção de sideróforos pelo biofilme controle. Quanto ao biofilme maduro de *B. pseudomallei*, não houve diferenças significativas na produção de sideróforos, após exposição às diferentes concentrações de ramnolipídio (Figura 15).

Figura 15. Efeito do biossurfactante ramnolipídio sobre a produção de sideróforos por *Burkholderia pseudomallei* na forma planctônica (A), biofilme formação (B) e na forma de biofilme maduro (C).



* Indica diferenças significativas ($P < 0,05$) na produção de sideróforos por *B. pseudomallei*, após exposição ao ramnolipídio, quando comparado ao respectivo controle de crescimento, não exposto ao composto.

6.2.1 Carbonilcianeto *m*-clorofenil-hidrazona (CCCP)

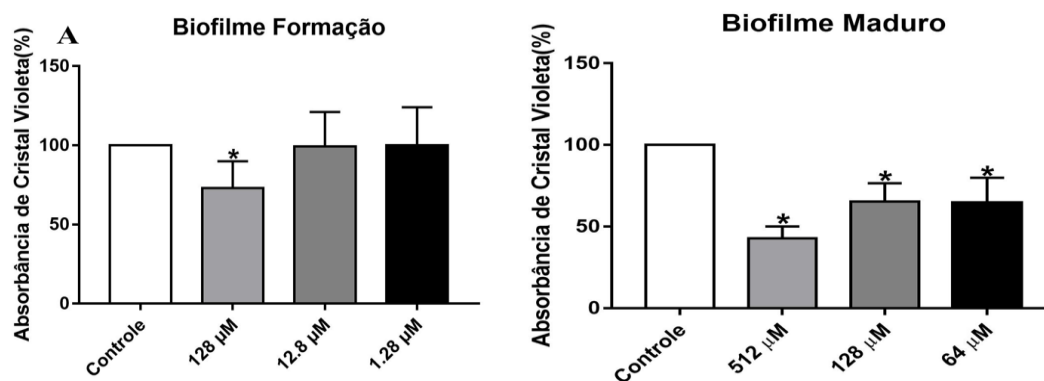
Inicialmente, foi avaliado o efeito do inibidor de bombas de efluxo CCCP sobre a formação de biofilmes e sobre biofilmes maduros. Para os biofilmes em

formação, observou-se que os valores de absorvância pela coloração da biomassa com cristal violeta foram de $0,264 \pm 0,109$ para o controle, e de $0,263 \pm 0,105$, $0,262 \pm 0,095$ e $0,192 \pm 0,073$ ($P < 0,05$) para crescimento nas concentrações 1,28, 12,8 e 128 μM de CCCP, respectivamente, demonstrando que somente a maior concentração testada reduziu significativamente a formação de biofilme por *B. pseudomallei* (Figura 16).

Posteriormente, foi avaliado o efeito do CCCP sobre biofilmes maduros, com 48 horas de crescimento. Os valores de absorvância pela coloração da biomassa com cristal violeta foram de $0,399 \pm 0,160$ para o controle, e de $0,258 \pm 0,099$, $0,260 \pm 0,074$ e $0,171 \pm 0,047$, nas concentrações de 64, 128 e 512 μM , respectivamente, sendo observadas reduções estatisticamente significativas ($P < 0,05$) nas três concentrações avaliadas (Figura 16).

Na análise do biofilme por microscopia confocal utilizando Live/Dead, observamos que houve a redução da espessura máxima do biofilme em formação (Figura 17), ademais, quando o CCCP foi adicionado ao biofilme maduro, após 48h de crescimento, reduziu significativamente ($P < 0,05$) em ambas as concentrações testadas a biomassa do biofilme, espessura da área total e espessura da biomassa. Porém, a coeficiente de rugosidade e a relação área volume aumentaram na concentração de 1228 μM . Ao analisar a intensidade da fluorescência pelo método do Ruby foram observadas diferenças estatísticas apenas na maior contração do biofilme maduro 512 μM (Figura 18).

Figura 16. Efeito do inibidor de bomba de efluxo carbonilcianeto m-clorofenil-hidrazona (CCCP) sobre a formação de biofilme (A) e sobre o biofilme maduro (B) de *Burkholderia pseudomallei*



*indica diferenças significativas ($P < 0,05$) na biomassa dos biofilmes de *B. pseudomallei*, após exposição ao CCCP, quando comparado ao respectivo controle de crescimento, não exposto ao composto.

Figura 17. Análise da microscopia confocal do CCCP em biofilmes de *B. pseudomallei*

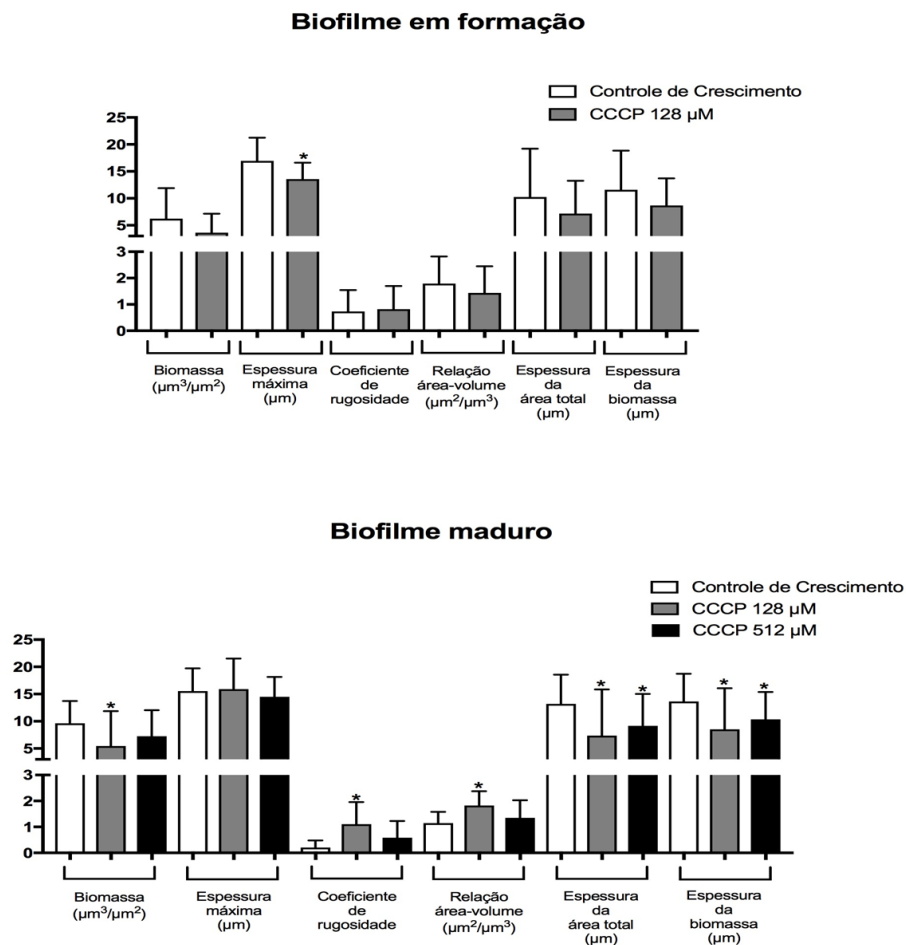
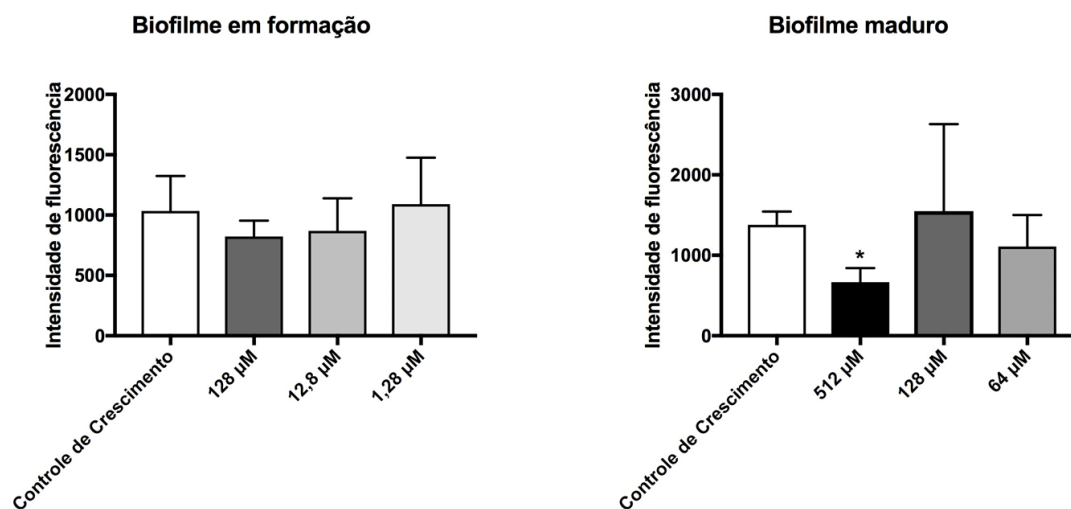
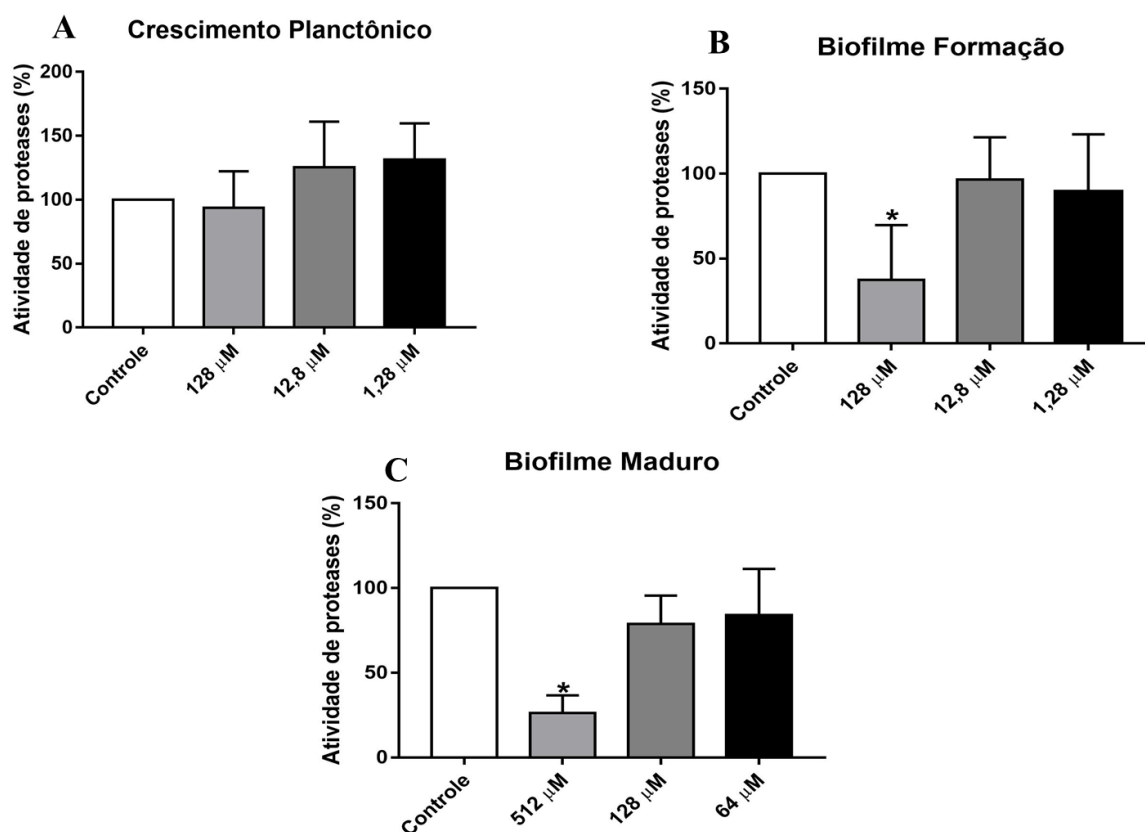


Figura 18. Detenção da biomassa pela fluorescência através do método de Ruby em biofilmes de *B. pseudomallei* associado ao CCCP.



Quanto à produção de proteases, o CCCP não interferiu significativamente na produção de proteases pelas células planctônicas (Figura 19/A). No tocante aos biofilmes em formação, houve uma redução significativa na produção de proteases somente na presença da maior concentração de CCCP (128 μ M), observando-se 61,4% de redução na atividade enzimática, quando comparada àquela do controle de crescimento. Quanto ao biofilme maduro, observou-se uma redução significativa somente na maior concentração testada de CCCP (512 μ M), evidenciando-se uma redução 72,9% ($P < 0.05$) da atividade enzimática, quando comparada àquela do controle de crescimento (Figura 19).

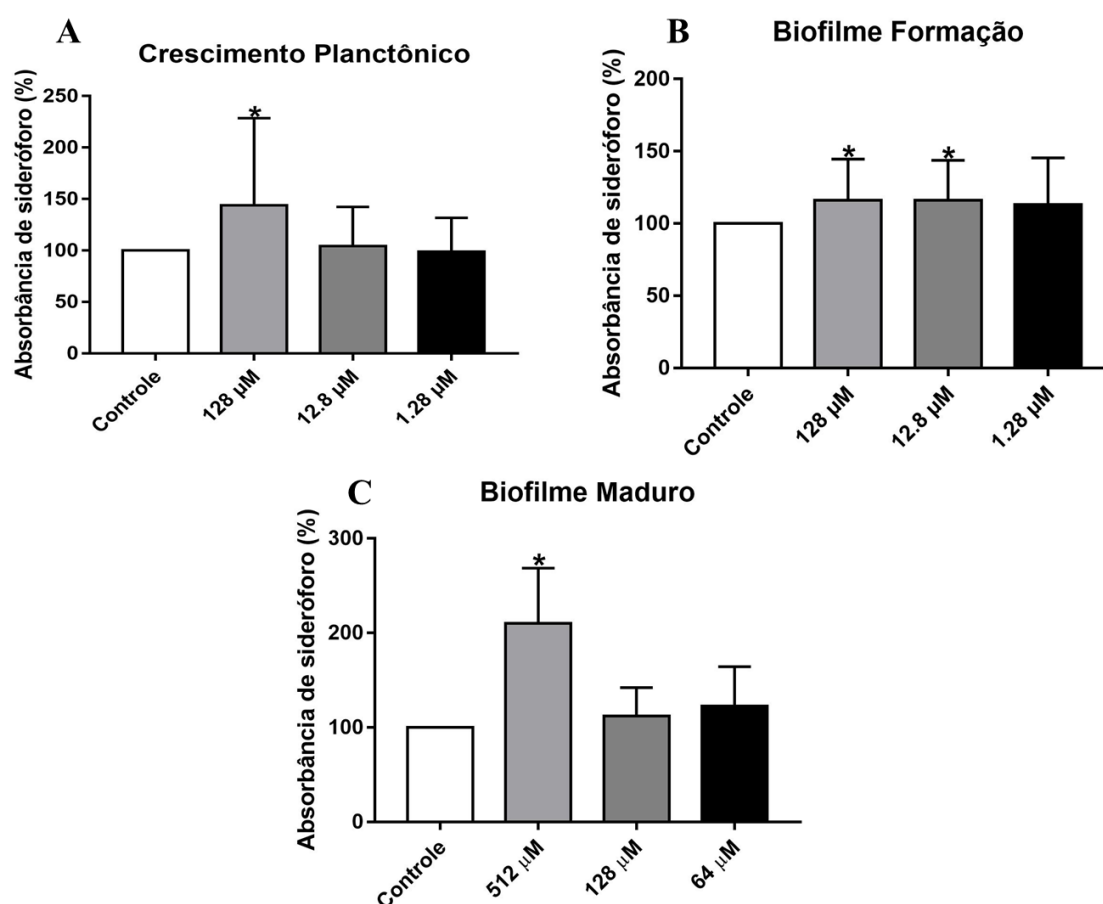
Figura 19. Efeito do inibidor de bomba de efluxo (CCCP) sobre a produção de proteases por *Burkholderia pseudomallei* na forma planctônica (A), biofilmes em formação (B) e na forma de biofilme maduro (C).



* Indica diferenças significativas ($P < 0,05$) na atividade de proteases por *B. pseudomallei*, após exposição ao CCCP, quando comparado ao respectivo controle de crescimento, não exposto ao composto.

No tocante aos sideróforos, observou-se um aumento significativo na produção ($P < 0,05$) pelo crescimento planctônico, somente após a exposição à maior concentração testada de CCCP ($128 \mu\text{M}$), na qual a produção foi 143,9% maior que àquela do controle de crescimento (Figura 20). Os biofilmes em formação demonstraram um aumento significativo ($P < 0,05$) na produção de sideróforos, após exposição às duas maiores concentrações de CCCP testadas ($12,8$ e $128 \mu\text{M}$), representando 116,7% e 118,2% da produção pelo biofilme controle. Quanto ao biofilme maduro de *B. pseudomallei*, houve um aumento significativo ($P < 0,05$) na produção de sideróforos na maior concentração testada de CCCP, representando 209% da produção pelo biofilme controle, não exposto ao composto (Figura 20).

Figura 20. Efeito do inibidor de bomba de efluxo (CCCP) sobre a produção de sideróforos por *Burkholderia pseudomallei* na forma planctônica (A), biofilmes em formação (B) e na forma de biofilme maduro (C).



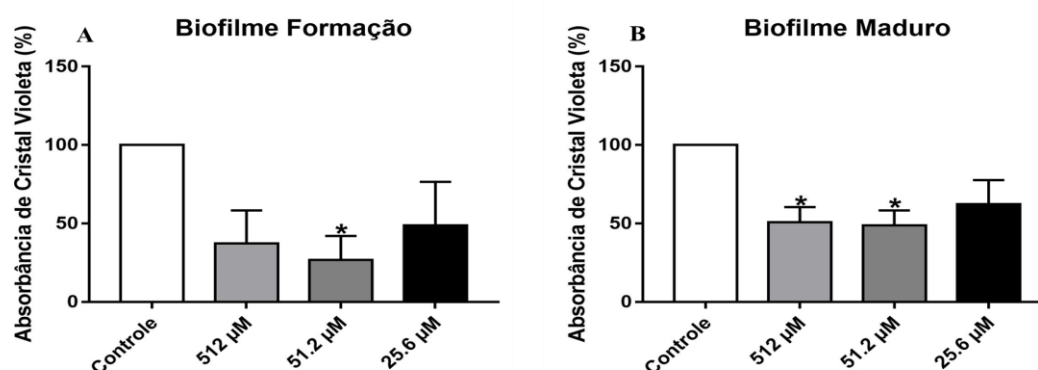
* Indica diferenças significativas ($P < 0,05$) na produção de sideróforos por *B. pseudomallei*, após exposição ao CCCP, quando comparado ao respectivo controle de crescimento, não exposto ao composto

6.2.3 Curcumina

Quando os biofilmes foram formados na presença de curcumina, observou-se uma redução significativa ($P < 0,05$) da biomassa, somente na concentração de 51,2 μM , atingindo uma redução de 42,5% na absorbância do cristal violeta, quando comparada aos valores do controle. Nas demais concentrações de curcumina, não foram visualizadas diferenças significativas (Figura 21/A). Posteriormente, foi avaliado o efeito da curcumina sobre biofilmes maduros, com 48 horas de crescimento. As duas maiores concentrações do composto reduziram significativamente ($P < 0,05$) a biomassa dos biofilmes maduros, atingindo reduções de 37,4% e 40,3% dos valores de absorbância do cristal violeta, na presença de 51,2 μM e 512 μM de curcumina, quando comparados aos valores do controle de crescimento. A menor concentração de curcumina não alterou significativamente a biomassa dos biofilmes maduros de *B. pseudomallei* (Figura 21/B).

Na análise do biofilme por microscopia confocal na presença de curcumina, observamos que houve a redução da biomassa, espessura da área total máxima do biofilme em formação (Figura 22), ademais, quando o curcumina foi adicionado ao biofilme maduro, após 48h de crescimento, reduziu significativamente ($P < 0,05$) em ambas as concentrações testadas a biomassa do biofilme, espessura da área total e espessura da biomassa. Ao analisar a intensidade da fluorescência pelo método do Ruby foi observado um aumento significativo apenas na maior contração do biofilme maduro 512 μM (Figura 23).

Figura 21. Efeito do inibidor de *quorum sensing* curcumina sobre a formação de biofilme (A) e sobre o biofilme maduro (B) de *Burkholderia pseudomallei*.



*indica diferenças significativas ($P < 0,05$) na biomassa dos biofilmes de *B. pseudomallei*, após exposição à curcumina, quando comparado ao respectivo controle de crescimento, não exposto ao composto.

Figura 22. Análise da microscopia confocal de curcumina associados aos biofilmes em formação e maduro de *B. pseudomallei*

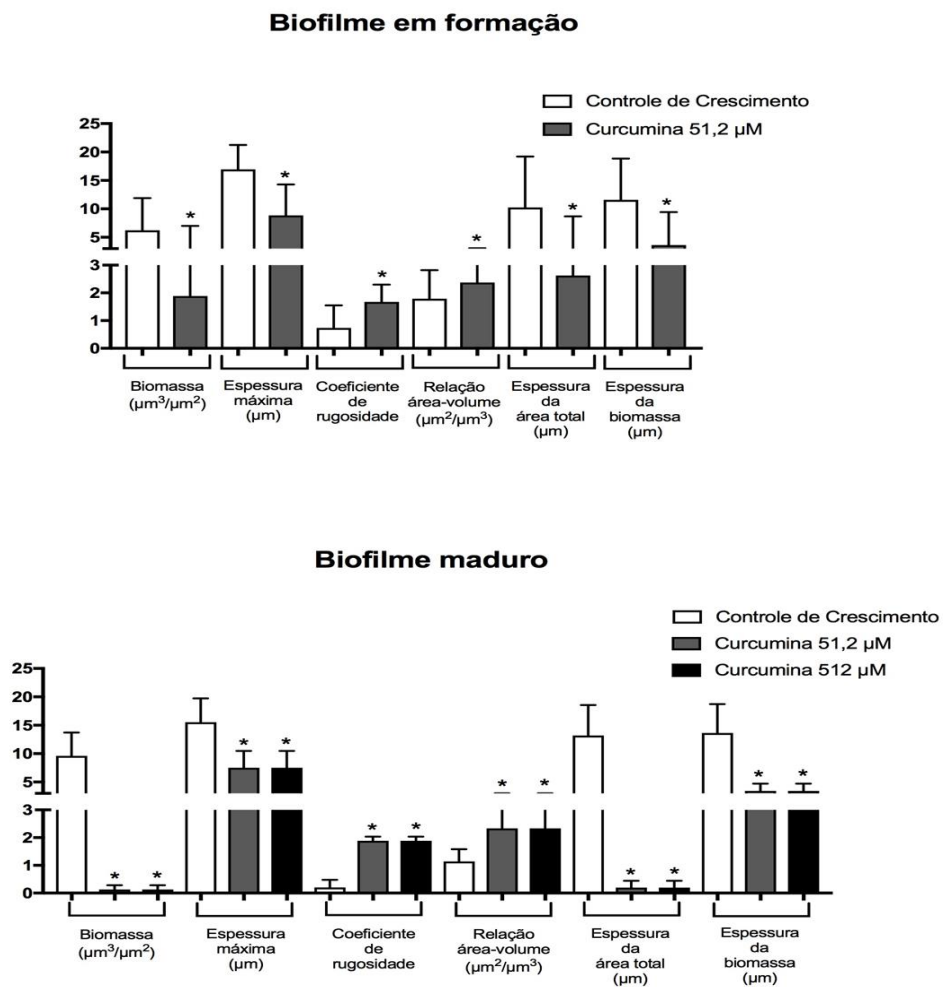
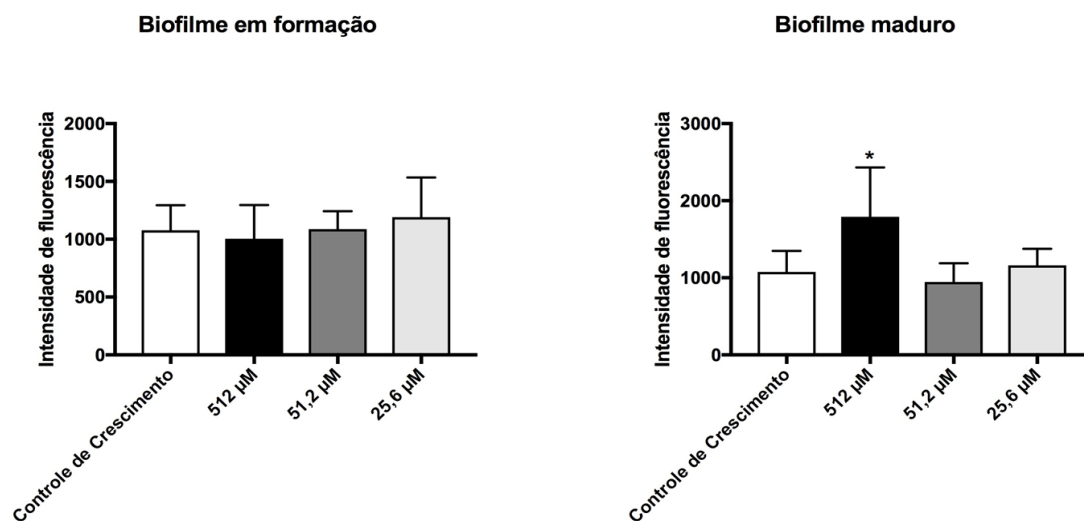
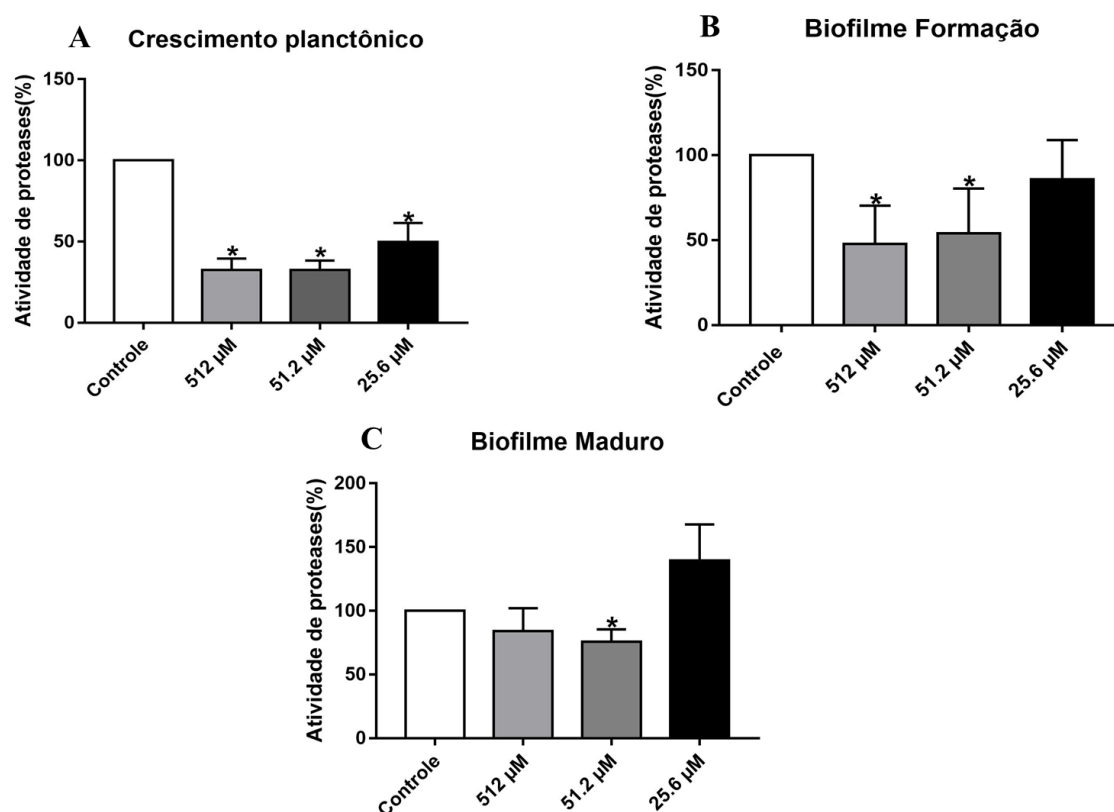


Figura 23. Detenção da biomassa pela fluorescência através do método de Ruby em biofilmes de *B. pseudomallei* associado a curcumina.



No tocante à produção de proteases, as três concentrações de curcumina, 25,6 μM , 51,2 μM e 512 μM , reduziram ($P < 0,05$) a atividade enzimática de células planctônicas de *B. pseudomallei* em 19%, 21% e 46,1%, respectivamente, quando comparadas ao controle de crescimento (Figura 24/A). Quanto aos biofilmes em formação, a curcumina alterou significativamente ($P < 0,05$) a atividade enzimática nas concentrações de 51,2 μM e 512 μM , reduzindo os valores de proteases em 46,9% e 42,4% da produção do controle de crescimento. A menor concentração (25,6 μM) de curcumina não alterou atividade enzimática dos biofilmes em formação. No biofilme maduro, somente a concentração de 51,2 μM alterou significativamente a atividade de protease, reduzindo-a em 69%, quando comparada àquela do controle de crescimento (Figura 24/C).

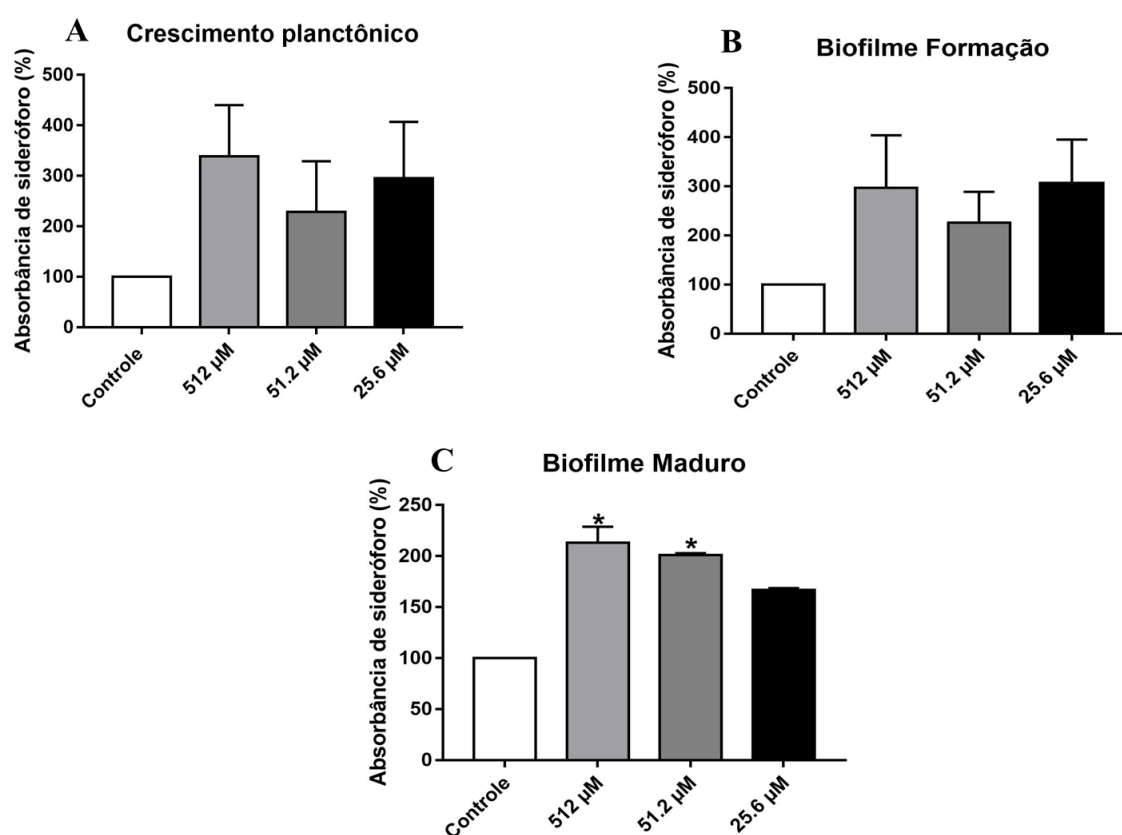
Figura 24. Efeito do inibidor de *quorum sensing* curcumina sobre a produção de proteases por *Burkholderia pseudomallei* na forma planctônica (A) biofilmes em formação (B) biofilme maduro (C).



* indica diferenças significativas ($P < 0,05$) na atividade de proteases por *B. pseudomallei*, após exposição à curcumina, quando comparado ao respectivo controle de crescimento, não exposto ao composto.

Quanto à produção de sideróforos, a curcumina não alterou a produção desse fator de virulência pelo crescimento planctônico, nem pelo biofilme em formação de *B. pseudomallei*, em nenhuma das concentrações testadas (Figura 25). Entretanto, no biofilme maduro, observou-se um aumento ($P < 0,05$) na produção de sideróforos em 115,3% e 122% nas concentrações de 51,2 μM e 512 μM , respectivamente, quando comparadas ao controle de crescimento (Figura 25/C).

Figura 25. Efeito do inibidor de *quorum sensing* curcumina sobre a produção de sideróforos por *Burkholderia pseudomallei* na forma planctônica (A) biofilmes em formação (B) biofilme maduro (C).



* Indica diferenças significativas ($P < 0,05$) na produção de sideróforos por *B. pseudomallei*, após exposição à curcumina, quando comparado ao respectivo controle de crescimento, não exposto ao composto.

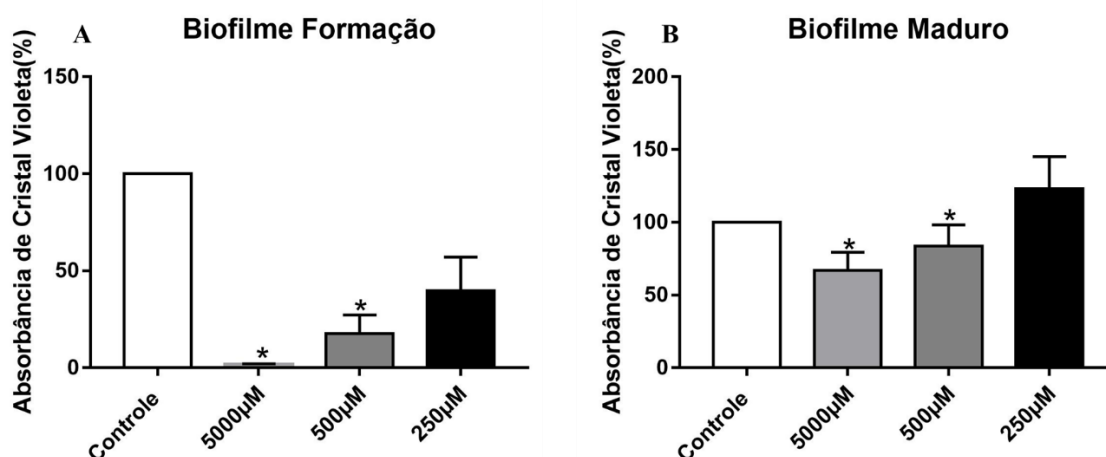
6.2.4 Furaneol

Quando os biofilmes foram formados na presença de furaneol, observou-se uma redução significativa ($P < 0,05$) da biomassa, atingindo 58,7% e 96,8% de redução na absorbância do cristal violeta, quando comparados aos valores do controle, na

presença de 500 μM e 5000 μM de furaneol, respectivamente. Na concentração de 250 μM , não foram visualizadas diferenças significativas (Figura 26/A). Posteriormente, foi avaliado o efeito do furaneol sobre biofilmes maduros, com 48 horas de crescimento. Semelhantemente ao observado para o biofilme em formação, as duas maiores concentrações do composto reduziram significativamente ($P < 0,05$) a biomassa dos biofilmes maduros, atingindo reduções de 37,4% e 48,9% dos valores de absorvância do cristal violeta, na presença de 500 μM e 5000 μM de furaneol, quando comparados aos valores do controle de crescimento. A menor concentração de furaneol não alterou significativamente a biomassa dos biofilmes maduros de *B. pseudomallei* (Figura 26/B).

Na análise do biofilme por microscopia confocal na presença de furaneol, observamos que houve a redução do coeficiente de rugosidade e relação área volumes do biofilme em formação (Figura 27), ademais, quando o furaneol foi adicionado ao biofilme maduro, após 48h de crescimento, reduziu significativamente ($P < 0,05$) em ambas as concentrações testadas a biomassa do biofilme, espessura da área total e espessura da biomassa. Porém, houve um aumento significativo ($P < 0,05$) no coeficiente de rugosidade e a relação área volume. Ao analisar a intensidade da fluorescência pelo método do Ruby foi observado um aumento significativo apenas nas concentrações do biofilme maduro 5000, 500, 250 μM (Figura 28).

Figura 26. Efeito do inibidor de *quorum sensing* furaneol sobre a formação de biofilme (A) e sobre o biofilme maduro (B) de *Burkholderia pseudomallei*.



* indica diferenças significativas ($P < 0,05$) na biomassa dos biofilmes de *B. pseudomallei*, após exposição ao furaneol, quando comparado ao respectivo controle de crescimento, não exposto ao composto.

Figura 27. Análise da microscopia confocal do furaneol associados aos biofilmes em formação e maduro de *B. pseudomallei*.

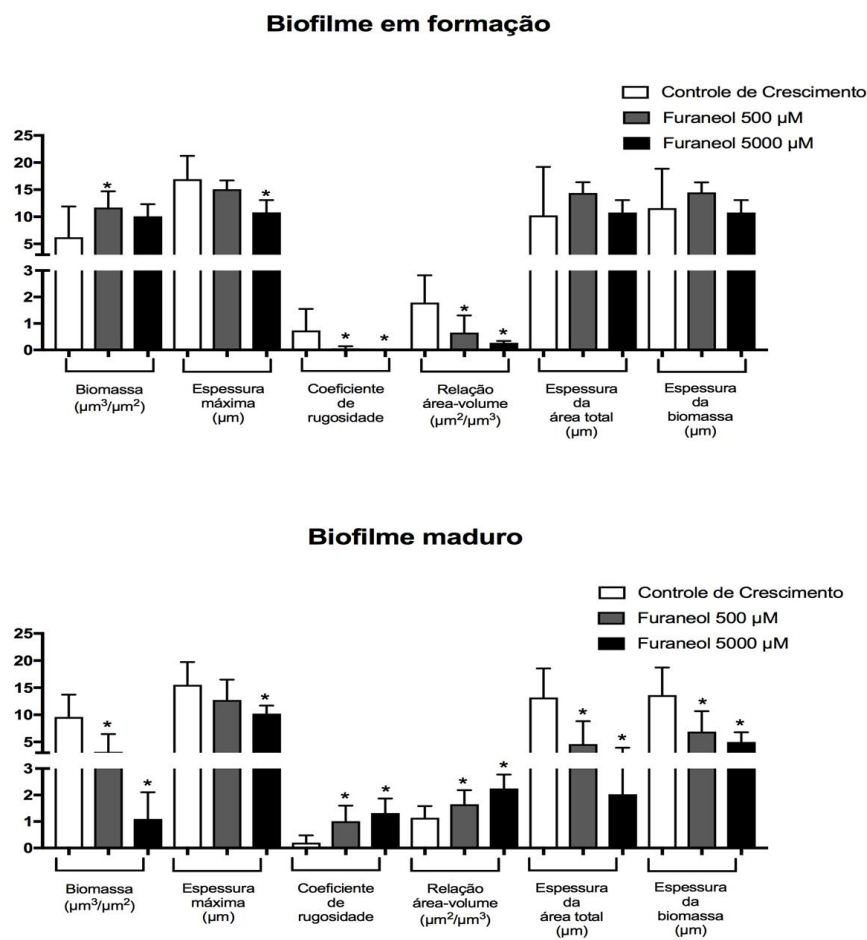
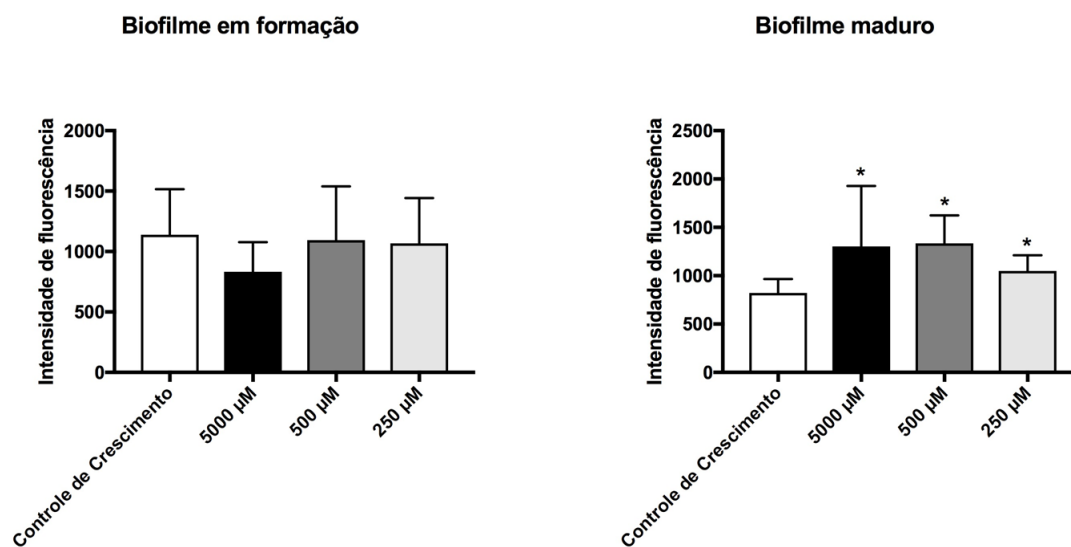
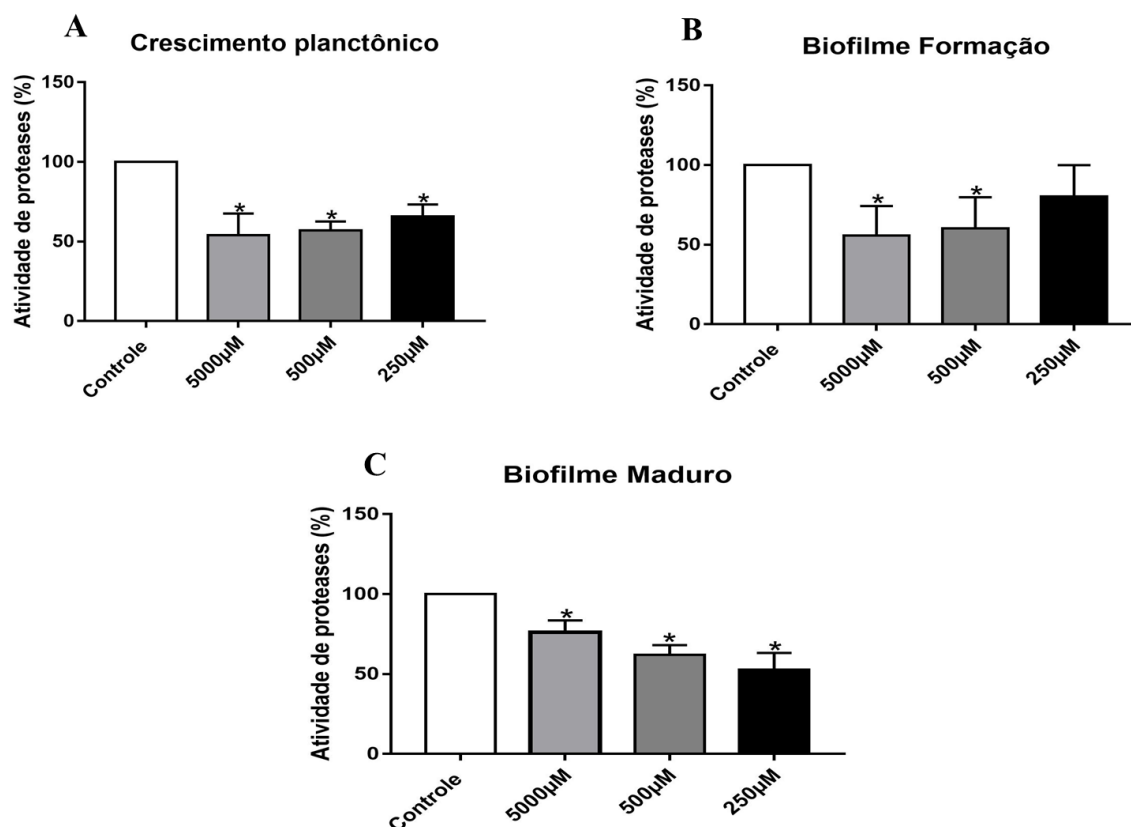


Figura 28. Detecção da biomassa pela fluorescência através do método de Ruby em biofilmes de *B. pseudomallei* associado a furaneol.



Quanto à produção de proteases, no crescimento planctônico, as três concentrações testadas reduziram significativamente a atividade de protease de *B. pseudomallei*, atingindo 32,4%, 40,4% e 51,2% de inibição, após exposição a 250 μ M, 500 μ M e 5000 μ M, quando comparadas ao controle de crescimento (Figura 29/A). No tocante aos biofilmes em formação, o furaneol, nas concentrações de 500 μ M e 5000 μ M, reduziu ($P < 0,05$) em 58% e em 61,1% a atividade enzimática desses biofilmes, respectivamente. Quanto aos biofilmes maduros, as três concentrações de furaneol inibiram significativamente a produção de proteases por essas estruturas bacterianas, alcançando reduções de 49,6%, 44,8% e 35,8%, na presença de 250 μ M, 500 μ M e 5000 μ M, respectivamente, quando comparados àqueles do controle de crescimento (Figura 29).

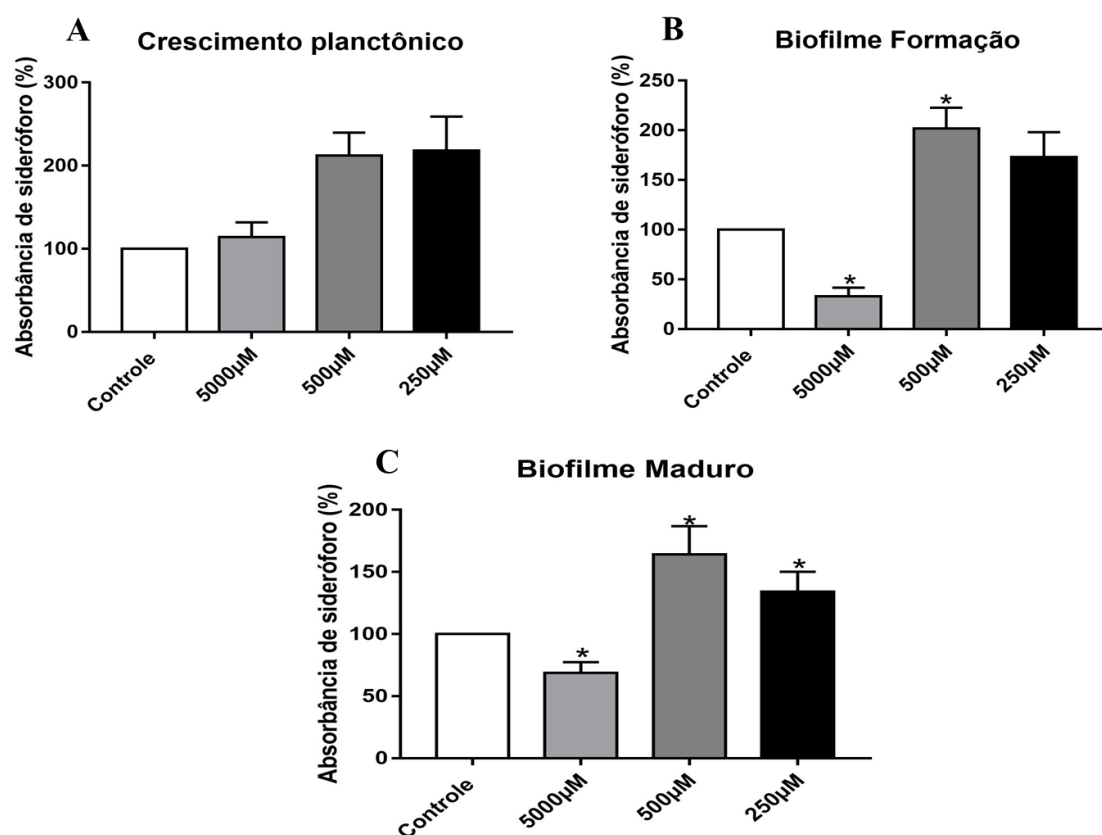
Figura 29. Efeito do inibidor de *quorum sensing* furaneol sobre a produção de proteases por *Burkholderia pseudomallei* na forma planctônica (A), biofilmes em formação (B) e biofilme maduro (C).



* indica diferenças significativas ($P < 0,05$) na atividade de proteases por *B. pseudomallei*, após exposição ao furaneol, quando comparado ao respectivo controle de crescimento, não exposto ao composto.

No tocante aos sideróforos, o furaneol não interferiu com a produção desse fator de virulência de *B. pseudomallei* na forma planctônica. Ademais, observou-se uma redução significativa ($P < 0,05$) na produção de sideróforos, na presença de furaneol a 5000 μM , tanto no biofilme em formação, quanto no biofilme maduro, apresentando 76,6% e 32,5% de inibição, respectivamente, quando comparados aos respectivos controles. Entretanto, em concentrações mais baixas, o furaneol induziu significativamente a produção de sideróforos tanto pelo biofilme em formação, quanto pelo biofilme maduro, representando 141% e 161% da produção do controle de crescimento, na concentração de 500 μM , respectivamente. Na concentração de 250 μM , o furaneol induziu ($P < 0,05$) a produção de sideróforos somente no biofilme maduro, apresentando 139,3% da produção do controle de crescimento (Figura 30).

Figura 30. Efeito do inibidor de *quorum sensing* furaneol sobre a produção de sideróforos por *Burkholderia pseudomallei* na forma planctônica (A), biofilmes em formação (B) e biofilme maduro (C).



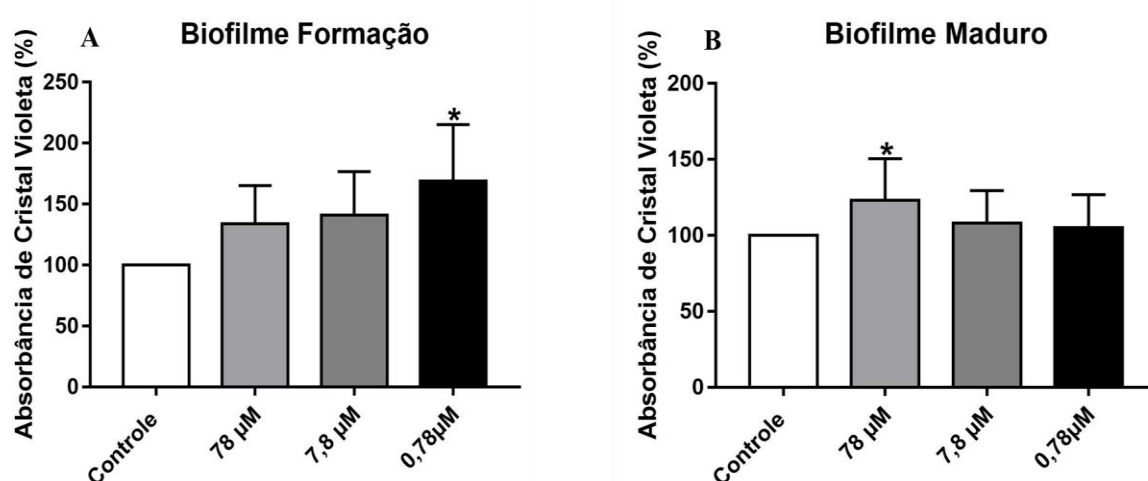
* Indica diferenças significativas ($P < 0,05$) na produção de sideróforos por *B. pseudomallei*, após exposição ao furaneol, quando comparado ao respectivo controle de crescimento, não exposto ao composto.

6.2. Octanoil- homosserina-lactona

Quando os biofilmes foram formados na presença de 8HSL, não foram observadas reduções significativas na biomassa, em nenhuma das concentrações testadas, quando comparadas ao controle de crescimento. Entretanto, na menor concentração (0,78 μM) foi observado um aumento significativo na produção de biomassa ($P < 0,05$) (Figura 31/A). Posteriormente, foi avaliado o efeito da 8HSL sobre biofilmes maduros, e observou-se que a maior concentração do composto aumentou significativamente ($P < 0,05$) a produção da biomassa, quando comparada ao controle de crescimento. As duas menores concentrações (7,8 e 78 μM) de 8HSL não alteraram a biomassa dos biofilmes maduros de *B. pseudomallei* (Figura 31/B).

Na análise do biofilme por microscopia confocal na presença de 8HSL, não foram observadas diferenças estatísticas entre as concentrações testadas no biofilme em formação (Figura 32). Ademais, quando o 8HSL foi adicionado ao biofilme maduro, após 48h de crescimento, reduziu significativamente ($P < 0,05$) em ambas as concentrações testadas a biomassa do biofilme, a espessura máxima, espessura da área total e espessura da biomassa. Porém, houve um aumento significativo ($P < 0,05$) no coeficiente de rugosidade e a relação área volume. Ao analisar a intensidade da fluorescência pelo método do Ruby foi observado um aumento significativo apenas nas menores concentrações do biofilme maduro (Figura 33).

Figura 31. Efeito da homosserina lactona (8HSL) sobre a formação de biofilme (A) e sobre o biofilme maduro (B) de *Burkholderia pseudomallei*.



* indica diferenças significativas ($P < 0,05$) na biomassa dos biofilmes de *B. pseudomallei*, após exposição ao HSL-8, quando comparado ao respectivo controle de crescimento, não exposto ao composto.

Figura 32. Análise da microscopia confocal do 8HSL associados aos biofilmes em formação e maduro de *B. pseudomallei*.

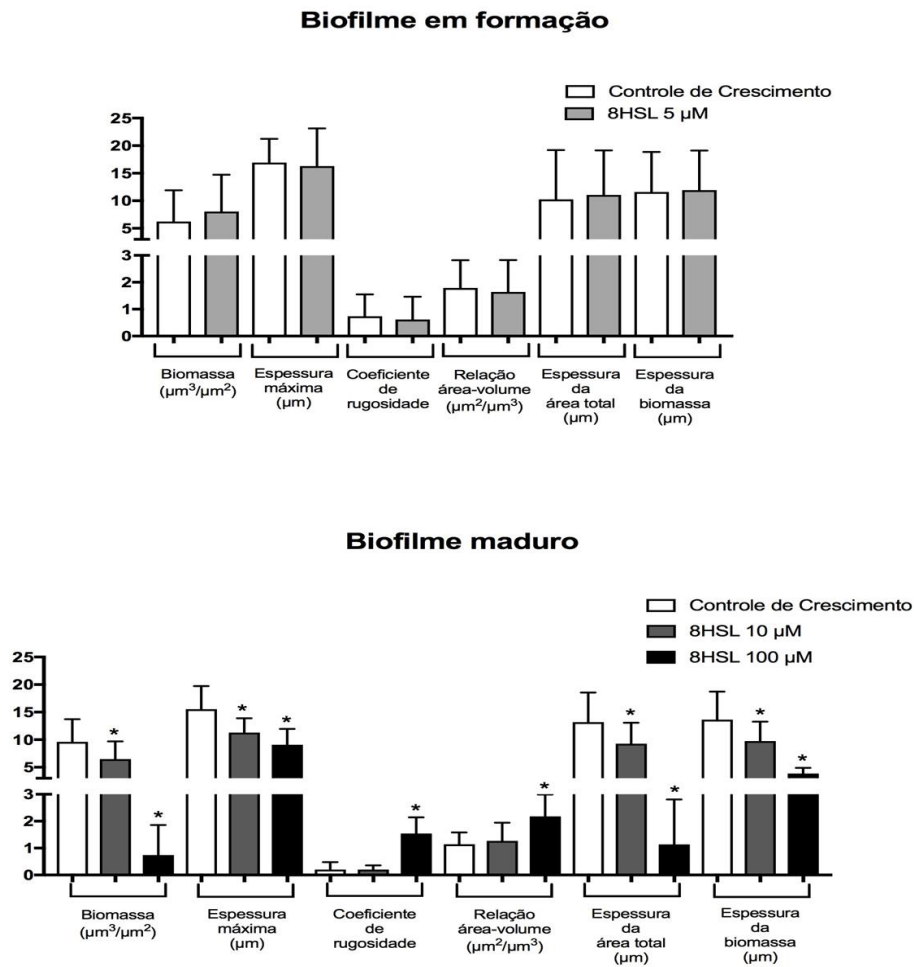
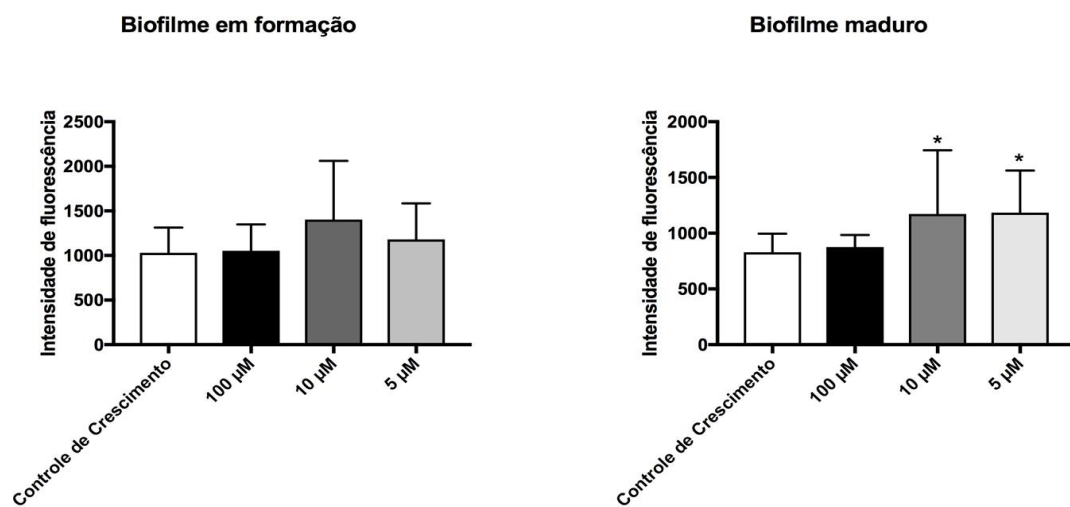
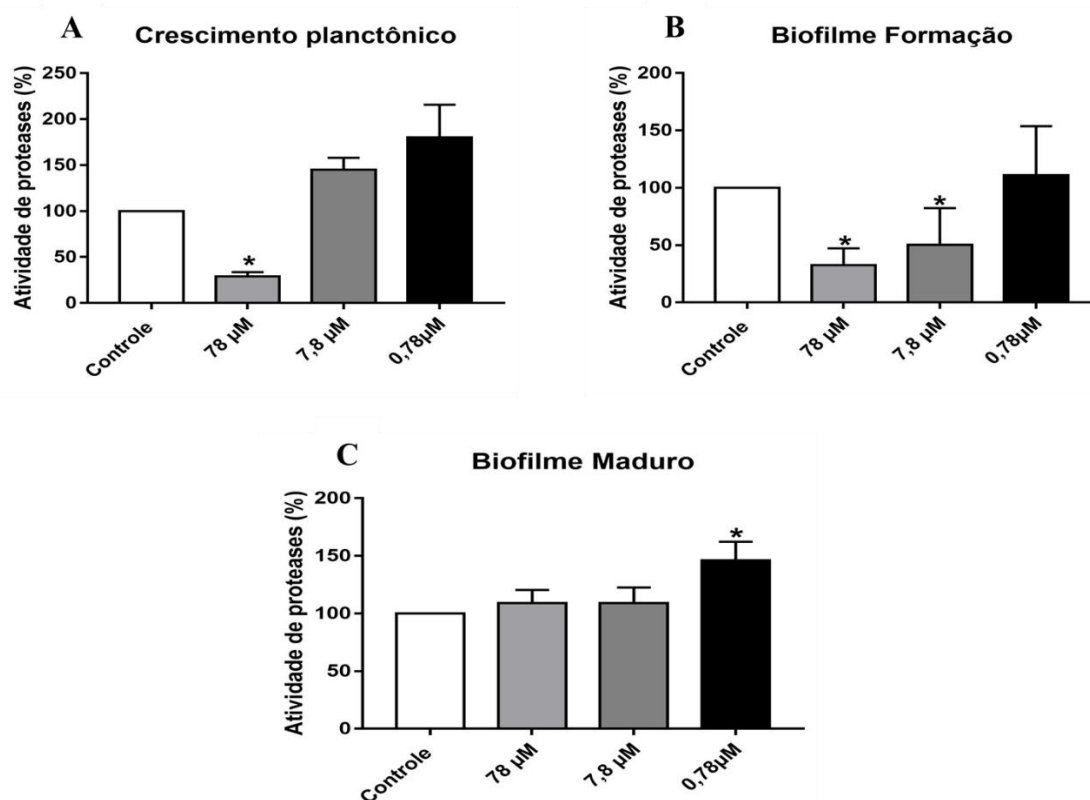


Figura 33. Detenção da biomassa pela fluorescência através do método de Ruby em biofilmes de *B. pseudomallei* associado a 8HSL.



Quanto à produção de proteases, 8HSL, na concentração de 78 μM , reduziu ($P < 0,05$) em 31,2% a atividade enzimática no crescimento planctônico de *B. pseudomallei*. No biofilme em formação, as duas maiores concentrações testadas reduziram significativamente a atividade de proteases de *B. pseudomallei*, atingindo 32,4%, 40,4% de inibição, após exposição a 78 μM e 7,8 μM , respectivamente, quando comparadas ao controle de crescimento (Figura 34/B). Quanto ao biofilme maduro, na menor concentração de 8HSL, houve um aumento significativo na produção de proteases por essas estruturas bacterianas, alcançando 136,3% nos valores de proteases, na presença de 0,78 μM respectivamente, quando comparado àqueles do controle de crescimento (Figura 34/C).

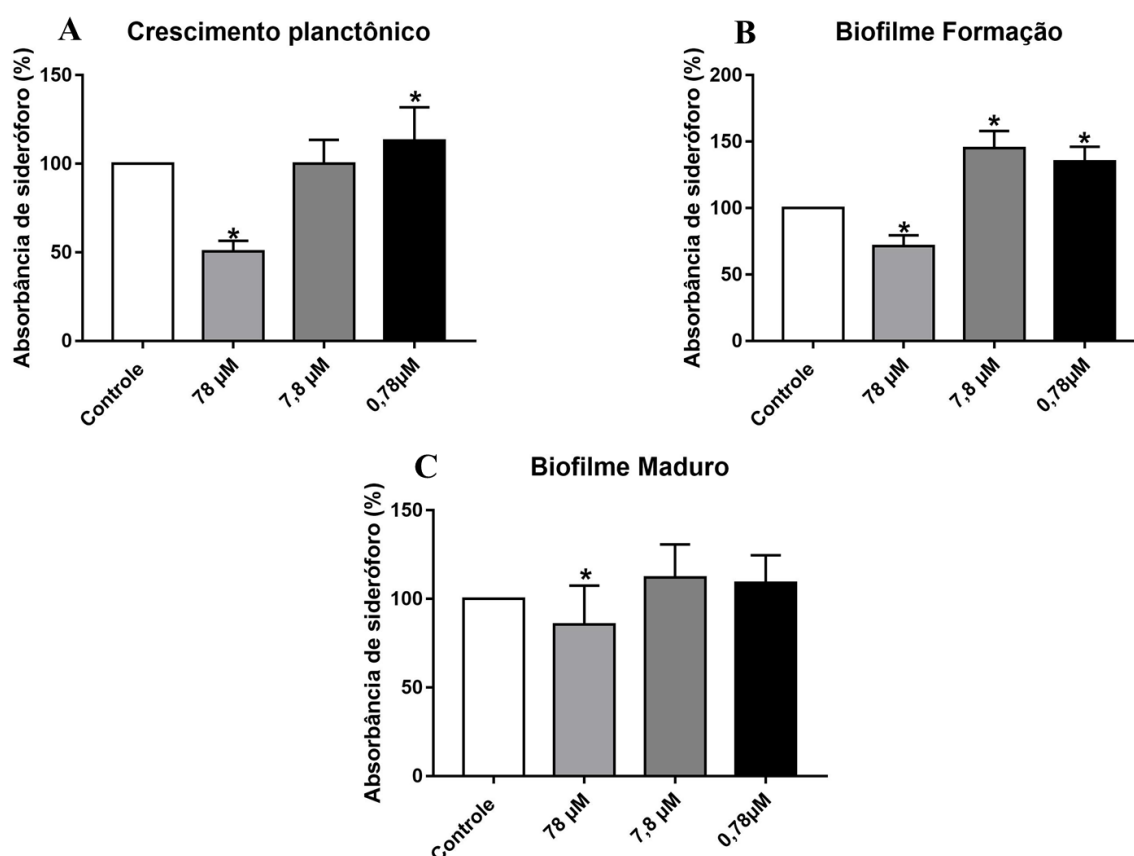
Figura 34. Efeito do 8HSL sobre a produção de proteases por *Burkholderia pseudomallei* na forma planctônica (A), biofilmes em formação (B) e biofilme maduro (C).



* indica diferenças significativas ($P < 0,05$) na atividade de proteases por *B. pseudomallei*, após exposição ao HSL-8, quando comparado ao respectivo controle de crescimento, não exposto ao composto.

No tocante aos sideróforos, o crescimento planctônico de *B. pseudomallei* apresentou uma redução significativa, em 62,5% ($P < 0,05$), na produção desse fator de virulência, após exposição a 78 μM de 8HSL, enquanto a exposição a 0,78 μM desse composto induziu significativamente a produção de sideróforos, representando 142% da produção do controle de crescimento. Quanto ao biofilme em formação, semelhantemente ao observado para o crescimento planctônico, a 8HSL reduziu, em 36,6% ($P < 0,05$), a produção de sideróforos, após exposição a 78 μM , mas aumentou a produção desse fator de virulência, após exposição a 7,8 e 0,78 μM . Para os biofilmes maduros, observou-se que na concentração de 78 μM , a 8HSL reduziu ($P < 0,05$) a produção de sideróforos, quando comparado ao controle de crescimento, mas nas menores concentrações, não interferiu com a produção desse fator de virulência (Figura 35).

Figura 35. Efeito do 8HSL sobre a produção de sideróforos por *Burkholderia pseudomallei* na forma planctônica (A), biofilmes em formação (B) e biofilme maduro (C).



* indica diferenças significativas ($P < 0,05$) na produção de sideróforos por *B. pseudomallei*, após exposição ao HSL-8, quando comparado ao respectivo controle de crescimento, não exposto ao composto.

Discussão

7. DISCUSSÃO

Biofilmes são estruturas compostas por células ligadas a uma superfície e protegida por uma matriz extracelular (KUNYANEE et al., 2016). A capacidade de formação de biofilme é importante na relação parasito-hospedeiro e no desenvolvimento de processo infeccioso, uma vez que as células associadas aos biofilmes apresentam características fenotípicas distintas, como aumento da produção de enzimas proteolíticas e resistência antimicrobiana (ADLER et al. 2013; FLEMMING et al., 2016).

No caso de biofilmes de *B. pseudomallei*, observa-se uma elevada tolerância aos antimicrobianos usados no tratamento da melioidose, principalmente devido ao aumento da produção e acúmulo de β -lactamases e ao aumento da expressão de bombas de efluxo (BRILHANTE et al., 2013; CASTELO-BRANCO et al., 2016; SIDRIM et al., 2017).

Acredita-se que essa tolerância não seja apenas associada à própria estrutura do biofilme e à diminuição da permeabilidade aos antimicrobianos, o que evita que concentrações adequadas de drogas interajam com as células bacterianas. A produção e o acúmulo de lactamases dentro da matriz extracelular de polissacarídeo também parece ser um mecanismo importante de resistência dos biofilmes (HENGZHUANG et al., 2013).

A formação dos biofilmes é um processo complexo envolvidos por diferentes etapas, finamente reguladas por diferentes moléculas. O mecanismo de *quorum sensing* está intimamente ligado as etapas iniciais da formação do biofilme. Embora sabendo que durante as etapas iniciais essas moléculas são produzidas em pequenas quantidades, mas vai aumento principalmente durante a etapa do acúmulo bacterianas. Portanto, o uso dos compostos que interferem ou modulam moléculas de *quorum sensing* (curcumina, furaneol e 8HSL) inibindo as homoserinas lactonas responsáveis pela comunicação intracelular, tem se mostrado os primeiros alvos no mecanismo de interrupção inicial da formação do biofilme (JABRA-RIZK et al., 2006; KALIA et al., 2012).

Segundo Tyagi et al. (2015), a curcumina facilmente se incorpora a membrana bacteriana, resultando em sua ruptura e liberação das AHLs, provavelmente tornando as bactérias mais vulnerável a ação destes compostos (TYAGI et al., 2015). Ademais o furuneol degrada diretamente as moléculas sinalizadoras (AHL) suprimindo a

detecção de *quorum sensing* bacteriana nas etapas iniciais de formação do biofilme (WU et al., 2004; DERYABIN et al., 2019).

Octanoil homosserina lactona, sendo moléculas dispersos no meio extracelular interfere antagonicamente com os receptores de sinal de AHL modulando as moléculas de *quorum sensing* (HENTZER et al., 2003; SHARIF et al., 2008). O aumento significativo na quantidade de 8HSL depende da densidade bacteriana. Assim, o acúmulo de 8HSL não é apenas paralelo ao crescimento, mas sim, parece que o aumento da atividade de 8HSL ocorre quando o biofilme atinge a densidade populacional máxima, principalmente nas etapas finais da maturação do biofilme (SHARIF et al., 2008;

Quanto ao ramnolipídio, por ser uma molécula emulsificante, interrompe biofilmes pré-formados, resultando em uma dispersão dos componentes da matriz do biofilme (LI et al., 2019; CARESA et al., 2019; SOOD et al., 2020). Ademais, o ramnolipídio interrompe biofilmes estabelecidos e impede a formação de novos biofilmes (CERESA et al., 2019; SOOD et al., 2020).

Além de sua alta toxicidade para a célula, CCCP é descrito como um inibidor clássico de bombas de efluxo, (MAHAMOUD, et al. 2007; IKONOMIDIS et al., 2008), desestruturando a matriz do biofilme maduro, por bloquear o transporte intracelular de glicoproteínas secretadas na membrana dos biofilmes e extrusão de moléculas de *quorum sensing* (SINHA et al., 2017; MENICHINI et al., 2019).

Embora a importância dos biofilmes na patogênese da infecção por bactérias seja clara, poucos relatos são publicados sobre efeito desses compostos em biofilmes de *B. pseudomallei* (HAULER et al., 2003; BUBEAU et al., 2009), especialmente no tocante aos reguladores da dinâmica dos biofilmes. Nesse contexto, o presente trabalho visou à melhor compreensão da fisiologia de biofilmes de *B. pseudomallei*, utilizando ferramentas farmacológicas, incluindo um biossurfactante, um inibidor de bombas de efluxo, dois inibidores de *quorum sensing* e uma molécula de *quorum sensing*.

Quanto a sensibilidade planctônica dos compostos (CIMs), observou-se que o ramnolipídio não inibiu o crescimento bacteriano em nenhuma das concentrações testadas. Entretanto, a partir de 78 µg/mL, foram observadas alterações no padrão de crescimento microbiano. Semelhante ao observado no estudo desenvolvido por

Ceresa et al. (2019), que demonstram que os ramnolipídios não apresentam atividades bactericidas (CERESA et al., 2019). Porém, quando o inibidor de bomba de efluxo CCCP foi testado, apresentou o CIM variando de 32 a 128 μM . O CCCP apresenta atividade citotóxica contra as células bacterianas nas maiores concentrações (MAHAMOUD, et al. 2007; IKONOMIDIS et al., 2008). Ademais, o CCCP, foi o único composto testado a apresentar o CEMBs nos biofilmes maduros. Brilhante et al. (2012) relatou que cepas de *B. pseudomallei* foram sensíveis à ação do farnesol um inibidor de bomba de efluxo.

Quanto à curcumina, ao furaneol e à 8HSL, nenhuma das concentrações testadas inibiu ou alterou o padrão de crescimento planctônico de *B. pseudomallei*.

Quanto à sensibilidade às drogas, observou-se que as CEMBs de todas as drogas eram, significativamente maiores que as CIMs, corroborando com achados prévios que mostram que biofilmes de *B. pseudomallei* são mais resistentes a antimicrobianos que o crescimento na forma planctônica (BRILHANTE et al., 2012; BANDEIRA et al., 2013; CASTELO-BRANCO et al., 2016; SIDRIM et al., 2016). Acredita-se que essa resistência se deve a própria estrutura do biofilme, alteração da permeabilidade celular, a produção de bombas de efluxos e a produção e acúmulo de β -lactamases dentro da matriz extracelular (HENGZHUANG et al., 2013). As β -lactamases acumuladas inativam os antimicrobianos à medida que penetram no biofilme, protegendo, assim, os micro-organismos (BRILHANTE et al., 2012a, b, SAROVICH et al., 2012; BANDEIRA et al., 2013).

Interessantemente, observou-se que a combinação dos compostos ramnolipídio, CCCP, curcumina, furaneol e 8HSL com os β -lactâmicos (MER, AMC) causou uma redução significativa no CIM de MER para todas as cepas testadas, por outro lado houve um aumento significativa de CIM para AMC. A resistência da melioidose a esse antibiótico têm sido constantemente relatadas (SAWASDIDOLN et al., 2010; SCHWEIZER, 2012), como em estudo prévio, no qual isolou-se 24 cepas provenientes de pacientes com melioidose e cada uma dessas cepas, apresentou resistência a amoxicilina/clavulanato (WUTHIEKANUN et al., 2011). No que se refere a sensibilidade do biofilme CEMB, houve a redução significativa dos dois β -lactâmicos (MER e AMC) avaliados. Esses achados podem estar associados à capacidade desses compostos de reduzir a biomassa dos biofilmes maduros, podendo

alterar a integridade da matriz e de moléculas de *quorum sensing*, o que facilitaria a penetração das drogas e levaria à liberação das β -lactamases, aumentando a eficácia dos β -lactâmicos e facilitando a penetração das drogas. Assim, com base nesses achados, o uso desses compostos em biofilmes maduros de *B. pseudomallei* pode auxiliar na dissociação das células e penetração de β -lactâmicos, podendo ser um importante adjuvante terapêutico.

No que se refere a ceftazidima, ao ser associado aos compostos reguladores de biofilmes reduziram os CIMs, e todas as cepas analisadas mostraram-se sensíveis, fato que é corroborado por achados de estudos anteriores (BANDEIRA et al., 2013b; CASTELO-BRANCO et al., 2016; SIDRIM et al., 2016). Apesar de haver um crescente número de trabalhos descrevendo o surgimento de cepas resistentes a esse antimicrobiano (CHANTRATITA et al., 2011; BRILHANTE et al., 2012; SAROVICH et al., 2012; SCHWEIZER, 2012; COX et al., 2014), os relatos de sensibilidade a ceftazidima são plausíveis e esperados, uma vez que esse é o fármaco de primeira escolha para o tratamento inicial da melioidose (DANCE, 2014), desde que se mostrou eficaz em reduzir a taxa de letalidade da doença pela metade (WHITE et al., 1989). Quando a ceftazidima foi associado aos compostos reguladores de biofilmes, somente observou-se a redução na CEMB da CAZ, quando esta foi combinada com CCCP (128 μ M). Assim, pode-se interpretar que os compostos atuaram principalmente na sensibilidade dos biofilmes de *B. pseudomallei* aos β -lactâmicos em questão, esta ação está provavelmente relacionada à supressão da produção de β -lactamases (HARTMAN et al., 2001; NIUMSUP; WUTHIEKANUN, 2002; IKONOMIDIS et al., 2008), em decorrência do contato com os compostos reguladores de biofilmes.

Quanto a associação dos compostos com a doxiciclina, notou-se que houve a redução significativa do CIM na presença de curcumina, furaneol e 8HSL. Em concordância com os achados deste estudo, Bandeira et al. (2013b) reportaram a sensibilidade de biofilmes de *B. pseudomallei* a esses antibióticos (BANDEIRA et al., 2013b; CASTELO-BRANCO et al., 2016), assim como outros estudos mostrando a sensibilidade desse antibiótico e esses compostos (SYBIYA et al., 2013; KALI et al., 2016). Ao associar os compostos com a doxiciclina no biofilme, somente foi observada a redução estatisticamente significativa nas CEMBs dessa droga, quando esta foi combinada com CCCP, mas não com os demais compostos. Nota-se que, no

trabalho de Castelo-Branco et al., (2016), ao associar doxiciclina e farnesol, observou-se a redução da CEMB. Diante disso, pode-se propor que o efeito inibitório do CCCP frente as bombas de efluxo foi mais notável na forma de biofilme, uma vez que a expressão dessas bombas é exacerbada no biofilme formado, justificando, assim, a redução dos valores de CEMB para doxiciclina de maneira significativa.

Ademais, ao associar trimetoprim-sulfametoxazol aos compostos reguladores de biofilmes na forma planctônica, houve uma redução significativa da CIM para ramnolipídio, CCCP e 8HSL. Nota-se que trimetoprim-sulfametoxazol apresenta sensibilidade a biofilmes de *B. pseudomallei* (BANDEIRA et al., 2013b; CASTELO-BRANCO et al., 2016; SIDRIM et al., 2016). Entretanto, houve um aumento da CIM para TSX quando associado aos inibidores de *quorum sensing* (curmumina e furaneol).

Acredita-se que deve haver efeito sinérgico dos inibidores de *quorum sensing*, resultando na ligação da PABA bacteriana, de modo que os compostos interferem com a biossíntese bacteriano. Porém, testes complementares são necessários para comprovar essa suposição. No que se refere à associação da trimetoprim-sulfametoxazol aos compostos reguladores de biofilmes, observou-se que somente o CCCP reduziu significativamente as CEMBs para esse antimicrobiano. A resistência de *B. pseudomallei* a esse antibiótico se dá pela expressão de bombas de efluxo (BIOT et al., 2013). Desse modo, pode-se presumir que o CCCP iniba a bomba de efluxo BpeEF-OprC, responsável pelo extravasamento de sulfonamidas e tetraciclina em cepas de *B. pseudomallei* (MIMA; SCHINIBIDA, 2010; BIOT et al., 2013; KRISHNAMOORTHY et al., 2019). No entanto, CCCP, sendo composto que interfere na síntese de ATP, na membrana bacteriana e têm uma grande capacidade de reduzir a viabilidade celular (MAHAMOUD, et al. 2007; IKONOMIDIS et al., 2008).

Além da resistência aos antimicrobianos, também avaliou o efeito do ramnolipídio em diferentes etapas de formação de biofilmes por *B. pseudomallei*. Observou-se que o ramnolipídio não interferiu na formação de biofilmes, quando adicionado às etapas iniciais de formação do biofilme. Por outro lado, quando o ramnolipídio foi adicionado ao biofilme maduro, com 48 horas de crescimento, este reduziu significativamente a biomassa desses biofilmes, nas concentrações mais altas de ramnolipídio. Esta diminuição pode resultar da ligação dos componentes de

ramnolipídio a moléculas de *quorum sensing* na estrutura do biofilme maduro, corroborando com a literatura que defende a importância dos biosurfactantes para a dispersão do biofilme (NICKZAD et al., 2014; MAYRI et al., 2015; ALEKSIC et al., 2017). Vale ressaltar que em nenhuma concentração testada houve a perda de viabilidade dos biofilmes, somente a redução da biomassa, o que corrobora com a hipótese de essa molécula está envolvida em processos fisiológicos dos biofilmes de *B. pseudomallei*, semelhantemente ao que é descrito para *Pseudomonas* spp. (KIM et al., 2016; WOOD et al., 2018).

O mecanismo do ramnolipídio na erradicação do biofilme pode estar relacionado a sua capacidade de destruir a matriz EPS, incluindo a eliminação de lipopolissacarídeos e proteínas através da formação de micela (JOVANOVIC et al., 2019). Estudos mostram que a parte hidrofóbica do ramnolipídio se insere na matriz EPS, enquanto a parte hidrofílica se estende até a fase aquosa, fazendo com que o EPS se desprenda da superfície (CHEN et al., 2019; JOVANOVIC et al., 2019).

Após a avaliação dos efeitos do ramnolipídio sobre a dinâmica de formação dos biofilmes, foi avaliado o efeito desse composto sobre a produção de proteases por *B. pseudomallei* na forma planctônica e de biofilmes. Observou-se que o ramnolipídio não interfere com a produção de proteases na forma planctônica, mas induz um aumento significativo na atividade de proteases pelos biofilmes em formação, apesar de não interferir com a biomassa desses biofilmes. A atividade de proteases pode ser detectada durante as etapas iniciais da formação de biofilmes microbianos (ELCHINGER et al., 2014; VASS et al., 2016; LINDSAY et al. 2017). Estudos anteriores sugerem que a *MprA*, uma metaloprotease de serina, é responsável pela maioria da atividade de proteases em sobrenadantes de *B. pseudomallei* (LEE et al., 2000; VALADE et al., 2004; BURTNICK et al., 2014; KAGER et al., 2014). Ademais, o ramnolipídio também induziu um aumento significativo na produção de proteases, nas duas maiores concentrações nos biofilmes maduros, provavelmente devido ao acúmulo de proteases aspárticas e nutrientes no interior do biofilme maduro. Connelly et al. (2004) demonstraram recentemente que as cepas mutantes de *Bacillus subtilis* sem proteases extracelulares eram incapazes de produzir biofilmes, mas a formação de biofilme pode ser restaurada pela adição de proteinase K (CONNELLY et al., 2004).

Além das proteases, foi avaliado o efeito do ramnolipídio sobre a produção de sideróforos, um importante fator de virulência bacteriano (SAHA et al., 2016; RIZZI et al., 2019). Observou-se que esta molécula induziu a produção de sideróforos por biofilmes em formação e por células planctônicas, apenas na maior concentração, mas não interferiu com a produção de sideróforos por biofilmes maduros. Sabe-se que os sideróforos atuam como um fator de crescimento bacteriano estimulando a formação de biofilmes (SAHA et al., 2016; RIZZI et al., 2019). Nas espécies de *Burkholderia*, os mecanismos de aquisição do ferro foram mais bem caracterizados em membros do complexo *Burkholderia cepacia* (WHITBY et al., 2006; THOMAS MS, 2007).

No entanto, o mecanismo de aquisição do ferro e sideróforos na formação de biofilme de *B. pseudomallei* não está completamente elucidado e parece ser uma característica específica da cepa (KVITKO et al., 2012). No biofilme de *P. aeruginosa*, tem sido demonstrado que a produção de sideróforos está intimamente relacionada à formação de biofilmes e que são essenciais para a formação e manutenção de biofilmes (KANG, KIRIENKO 2018; YU et al. 2016). Além disso, a alta disponibilidade de ferro estimula a produção do exopolissacarídeo de matriz de biofilme, que, por sua vez, sequestra o ferro ferroso, atuando como depósito de ferro, garantindo a manutenção do biofilme de *P. aeruginosa* (YU et al. 2016).

No que se refere ao CCCP, observou-se que pouco alterou a biomassa dos biofilmes de *B. pseudomallei* em formação, demonstrando que as bombas de efluxo não parecem ter um papel essencial no processo de formação dos biofilmes. Entretanto, quando o CCCP foi adicionado aos biofilmes com 48 horas de crescimento, observou-se uma redução significativa da biomassa, em todas as concentrações testadas. Esses achados sugerem que as bombas de efluxo são essenciais para a manutenção do biofilme maduro, provavelmente, por serem responsáveis por eliminar compostos tóxicos oriundos do metabolismo celular. Assim, a inibição da atividade dessas bombas pode enfraquecer as células e a estrutura do biofilme (KVIST et al., 2008). Com base nos dados observados, acredita-se que a perda da atividade de detoxificação celular gere mais prejuízos para o biofilme que a possível redução na liberação de moléculas de *quorum sensing* para o meio externo, uma vez que os efeitos deletérios do CCCP foram observados principalmente no biofilme maduro e não no biofilme em formação (MAHAMOUD, et al. 2007; IKONOMIDIS et al., 2008).

Em seguida, foi avaliado o efeito desse composto sobre a produção de proteases por *B. pseudomallei* na forma planctônica e de biofilmes. Observou-se que o CCCP não interfere com a produção de proteases na forma planctônica, por outro lado, houve uma redução significativa na atividade de proteases dos biofilmes em formação e dos biofilmes maduros, principalmente na maior concentração testada. De facto, as proteases podem ser produzidas ao longo dos tempos da formação de biofilmes (MARLON et al., 2014). Porém, o mecanismo de ação de CCCP sobre a produção de proteases extracelulares em biofilmes de *B. pseudomallei* ainda não foi esclarecido. No entanto, a co-produção dessas moléculas pode indicar a necessidade de aumentar a aquisição de nutrientes do ambiente extracelular quando o biofilme é formado (CONNELLY et al., 2004; MARLON et al., 2014).

Quanto à produção de sideróforo, observou-se que esta molécula induziu a produção de sideróforos por biofilmes em formação e por células planctônicas, apenas na maior concentração, mas não interferiu com a produção de sideróforos por biofilmes maduros. Cheng et al. (2012), observou que as cepas mutantes de *Pseudomonas aeruginosa* expostos ao farnesol, mostraram a sensibilidade aumentada, sugerindo que múltiplos fatores podem influenciar a concentração intracelular do sideróforos.

Em relação aos inibidores e moduladores de *quorum sensing*, observou-se que interferem na formação do biofilme, quando adicionados as etapas iniciais da formação do biofilme. Quando curcumina e furaneol foram adicionados ao biofilme em formação e ao biofilme maduro estes reduziram significativamente a biomassa desses biofilmes, nas concentrações mais altas. Esta diminuição pode resultar na ligação destes compostos ao AHL, durante o desenvolvimento de biofilmes. Corroborando com a literatura, demonstrando que estes compostos interferem nas moléculas de *quorum sensing* bloqueando a comunicação intracelular (CHOI et al., 2014; GARCIA-CONTRERAS et al., 2015; BOSE et al., 2020). O 8HSL, quando associado ao biofilme em formação e biofilme maduro, não houve nenhuma redução da biomassa. Corroborando com estudo de Davies et al. (2015), que demonstra que 8HSL está envolvida na adesão inicial à superfície e na maturação do biofilme de *Aeromonas hydrophila* (LYNCH et al., 2002). O mecanismo de curcumina, furaneol e 8HSL na erradicação do biofilme pode estar relacionado a sua capacidade de bloquear

moléculas de *quorum sensing* interferindo nos receptores cognatos de AHL (LADE et al., 2014; CHOI et al., 2014; HUSAIN et al., 2019).

Após avaliar efeitos destes compostos sobre a dinâmica de formação dos biofilmes, foi analisada a produção de proteases por *B. pseudomallei* na forma planctônica e de biofilmes. Observou-se também que, curcumina e furaneol interferem com a produção de proteases na forma planctônica, biofilme formação e biofilme maduro. Por outro lado, 8HSL aumentou a produção de proteases pelos biofilmes maduro na menor concentração, assim interferindo com a biomassa desses biofilmes. Curiosamente, a atividade de proteases pode ser detectada durante as etapas iniciais da formação de biofilmes microbianos (ELCHINGER et al., 2014; VASS et al., 2016; LINDSAY et al. 2017).

A importância do sideróforo para os diferentes fatores de virulência bacterianos (ENG, NATHAN, 2015; SAHA et al., 2016; RIZZI et al., 2019), nos levou a analisar o efeito de curcumina, furaneol e 8HSL sobre a produção de sideróforos em diferentes etapas da formação de biofilmes. Observou-se que a curcumina induziu a produção de sideróforos na forma planctônica, biofilmes em formação e biofilmes maduros, possivelmente, como uma resposta à indisponibilidade do ferro para as bactérias. Estudos anteriores usando técnicas espectroscópicas caracterizaram a ligação da curcumina ao ferro e cobre em condições não fisiológicas (SREEJAYAN, RAO 1994; BAUM, NEG 2004; ENG, NATHAN, 2015; KALI et al., 2016). No entanto, a evidência de que a curcumina liga o ferro nas células e tecidos é indireta. Em camundongos, a curcumina na dieta diminuiu a ferritina (JIAO et al. 2006, 2009) e ferro (CHIN et al. 2014; BADRIA et al. 2015) no fígado, ambos consistentes com uma redução das reservas corporais de ferro. Na cultura celular, a curcumina reduziu os efeitos citotóxicos do ferro nas células tumorais (MESSNER et al. 2009; MESSNER et al. 2017).

Em relação ao furaneol, observou-se uma redução na produção de sideróforos, após exposição às maiores concentrações do composto, e um aumento após exposição à concentração intermediária ou a menor concentração do furaneol. Ademais, a 8HSL reduziu a produção de siderofóros apenas na maior concentração em todas as etapas do desenvolvimento do biofilme, porém nas menores concentrações houve um

aumento significativo na produção de siderofóros. Esse aumento se dá provavelmente devido o estresse oxidativo induzido por 8HSL na menor concentração.

Ademais, buscou-se estudar os mecanismos responsáveis pela ação dos compostos frente aos biofilmes de *B. pseudomallei*. Para tanto, as análises microscópicas dos biofilmes de *B. pseudomallei* revelaram que a exposição as concentrações de ramnolipídio, CCCP, curcumina, furaneol e 8HSL promoveu a desestruturação da matriz e, conseqüentemente, a destruição do biofilme. Pode-se crer, que esses danos ocorrem por meio de desagregação da matriz, hidrofobicidade, bloqueio no sistema de comunicação e conseqüentemente desacoplação de canais de águas e nutrientes que são essenciais para a manutenção de biofilmes. Estudos anteriores constataram que a ação inibitória destes compostos em biofilmes bacterianos ocorre por meio desse mecanismo de ação (GOMES et al., 2011; CERCA et al., 2012; DUSANE et al., 2012; . DÍAZ DE RIENZO et al., 2016; CASTELO-BRANCO et al., 2016).

Segundo DÍAZ DE RIENZO et al. (2016), a remoção da matriz EPS, pode ser benéfica no tratamento de biofilmes. Os autores observaram que os complexos de proteínas de lipopolissacarídeos da membrana celular externa foram removidos pelos ramnolipídios. Curiosamente a remoção da camada de EPS é conhecida por aumentar o efeito de agentes antimicrobianos. Ademais, quando os inibidores de *quorum sensing* e molécula de *quorum sensing* foram adicionados aos biofilmes formados, as estruturas não foram destruídas, porém, as células incorporadas ao biofilme foram completamente mortas nas maiores concentrações testadas. Nossos dados sugerem que, curcumina, furaneol e 8HSL, podem ser um ponto de partida promissor para o desenvolvimento de agentes coadjuvantes para a terapia combinada de biofilmes de *B. pseudomallei*.

Para as amostras expostas as menores concentração de CEMB dos compostos, notou-se que não houve desagregação de matriz, possivelmente devido à concentração insuficiente dos compostos, no entanto, observou-se o predomínio de células inviáveis. Pode-se supor que, esses compostos foram capazes de ligar-se à membrana celular, causando a ruptura mecânica dessa estrutura e, finalmente, a inviabilidade das células (CASTELO-BRANCO et al., 2016; SIDRIM et al., 2016).

Diante disso, este estudo ressaltou a importância da estrutura do biofilme na promoção da resistência de *B. pseudomallei*. Tal conformação morfológica foi capaz

inclusive de promover a resistência da bactéria aos antibióticos convencionalmente utilizados no tratamento da melioidose. Esses achados são de bastante relevância clínica, uma vez que a melioidose apresenta caráter crônico e, os dados de resistência encontrados neste estudo podem ser correlacionados com a incidência de casos de recidiva da doença.

Adicionalmente, o uso destes compostos frente ao biofilme maduro de *B. pseudomallei* mostrou-se eficaz, uma vez que os compostos foram capazes de desagregar a matriz do biofilme, bloquear o sistema de comunicação, tornando assim as bactérias mais acessíveis à ação dos antibióticos, doxiciclina, meropenem, ceftazidima, amoxicilina-clavulanato e sulfametoxazol-trimetoprim.

Conclusão

8. CONCLUSÃO

Ramnolipídio desestrutura biofilme de *B. pseudomallei*, inibindo a biomassa do biofilme maduro, porém não interfere com a produção de fatores de virulência (proteases, sideróforos) na forma planctônica, biofilme formação e biofilme maduro.

O inibidor de bomba de efluxo (CCCP) reduziu a biomassa dos biofilmes de *B. pseudomallei* e a produção de proteases na maior concentração, porém não interferiu na produção de sideróforos.

Os inibidores de *quorum sensing* (curcumina e furaneol) reduziram a biomassa dos biofilmes e proteases nas maiores concentrações, ademais, apenas o furaneol interferiu na produção de sideróforos no biofilme em formação e maduro.

O modulador de *quorum sensing* (8HSL) não interferiu na biomassa dos biofilmes, porém houve uma redução na produção de fatores de virulências (proteases, sideróforos) na maior concentração nos biofilmes de *B. pseudomallei*.

Os compostos ramnolipídeo, CCCP, curcumina, furaneol e 8HSL mostraram-se capazes de degenerar a matriz do biofilme de *B. pseudomallei*, reduzindo a biomassa e facilitando a penetração dos antimicrobianos.

9. PERSPECTIVAS

O presente trabalho demonstrou resultados que vêm a somar conhecimentos a respeito da resistência e dificuldade no tratamento de paciente com infecção por *B. pseudomallei*, principalmente quando associado a formação de biofilme. Diante desta problemática, este trabalho trouxe perspectivas acerca do aumento da sensibilidade do biofilme de *B. pseudomallei* aos antibióticos, gerada pela exposição a compostos não antimicrobianos. Nesse panorama, o uso do ramnolipídeo, CCCP, curcumina, furaneol e 8HSL como compostos adjuvantes mostraram-se promissores, uma vez que desestruturaram a matriz do biofilme, facilitando a penetração e, conseqüentemente, a ação dos antimicrobianos. O presente trabalho também amplia o panorama para os estudos que buscam alternativas terapêuticas com a utilização destes compostos.

10. REFERÊNCIAS

ABISADO, R.G; BENOMAR, S; KLAUS, J.R; DANDEKAR, A.A; CHANDLER, J.R. Bacterial Quorum Sensing and Microbial Community Interactions. *MBio*, v.3, 02331-17, 2018.

ALLISON, K. R; BRYNILDSEN, M.P; COLLINS, J.J. Heterogeneous bacterial persisters and engineering approaches to eliminate them. **Current Opinion in Microbiology**, v. 14, p. 593-598, 2011.

ALLWOOD, E. M; DEVENISH, R. J; PRESCOTT, M; ADLER, B. & BOYCE, J. D. Strategies for intracellular survival of *Burkholderia pseudomallei*. *Frontier Microbiology*. v.2, p.170-75, 2011.

AMADASI S; DAL ZOPPO S; BONOMINI A; BUSSI A; PEDRONI P; BALESTRIERI G; SIGNORINI L; CASTELLI F. A case of melioidosis probably acquired by inhalation of dusts during a helicopter flight in a healthy traveler returning from Singapore. *Journal of Travel Medicine*. v.22, p.57–60, 2015.

ANJALI KUMARI & PATRIZIA PASINI & SYLVIA DAUNERT. Detection of bacterial quorum sensing N-acyl homoserine lactones in clinical samples. **Anal Bioanal Chemestre**, v.391, p.1619–1627, 2008.

ASHDOWN, L.R. An improved screening technique for isolation of *Pseudomonas pseudomallei* from clinical specimens. *Pathology* v.11, p.293–7, 1979.

ASHDOWN, L.R; CLARKE, S.G. Evaluation of culture techniques for isolation of *Pseudomonas pseudomallei* from soil. *Applie Enviromental Microbiology*, v.58, p.4011–5, 1992.

BALDER, R; LIPSKI, S; LAZARUS, J.J; GROSE, W; WOOTEN, R.M; HOGAN, R.J; WOODS, D.E; LAFONTAINE, E.R. Identification of *Burkholderia mallei* and *Burkholderia pseudomallei* adhesins for human respiratory epithelial cells. **BMC Microbiology**. v.10, p.250-61, 2010.

BANDEIRA, T. J. P. G; BRILHANTE, R. S. N; ROCHA, M. F. G; MOREIRA, C. A; CORDEIRO, R. A; RIBEIRO, J. F; CASTELO-BRANCO, D. S. C. M; SIDRIM J. J. C. In vitro antimicrobial susceptibility of clinical and environmental strains of *Burkholderia pseudomallei* from Brazil. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 42, p. 375-377, 2013a.

BANDEIRA, T. J. P. G; MOREIRA, C. A; BRILHANTE, R. S. N; CASTELO-BRANCO, D. S. C. M; NETO, M. P. A; CORDEIRO, R. A; RODRIGUES, T. J. S; ROCHA, M. F. G; SIDRIM, J. J. C. “In vitro activities of amoxicillin-clavulanate, doxycycline, ceftazidime, imipenem, and trimethoprim-sulfamethoxazole against biofilm of brazilian strains of Burkholderia pseudomallei.” *Antimicrobial agents and chemotherapy*, v. 57, p. 5771–5773, 2013b.

BANDEIRA, T.J.P.G; CASTELO-BRANCO, D.S.C.M; ROCHA, M.F.G; CORDEIRO, R.A; OCADAQUE, C.J; PAIVA, M.A.N; BRILHANTE, R.S.N; SIDRIM, J.J.C. Clinical and environmental isolates of Burkholderia pseudomallei from Brazil: Genotyping and detection of virulence gene. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, v.10, p.945-951, 2017.

BARUAH K; DANG T.V.C; D KRISTOF; WILLE W, DEFOIRD T; SORGELOOS P; BOSSIER P. In vivo effects of single or combined N-acyl homoserine lactone quorum sensing signals on the performance of Macrobrachium rosenbergii larvae. *Aquaculture*, v. 288 p.233–238, 2009.

BAST, A; KRAUSE, K; SCHMIDT, IH; PUDLA, M; BRAKOPP, S; HOPF, V; BREITBACH, K; STEINMETZ, I. Caspase-1-dependent and -independent cell death pathways in Burkholderia pseudomallei infection of macrophages. *PLoS Pathogens*. v.3, p.139-86, 2014.

BENOIT, T.J; BLANEY, D.D; GEE, J.E; ELROD, M.G; HOFFMASTER, A.R; DOKER, T.J; BOWER, W.A; WALKE, H.T. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Melioidosis Cases and Selected Reports of Occupational Exposures to Burkholderia pseudomallei—United States, 2008-2013. *Morbidity and Mortality Weekly Report Surveillance Summaries*, v.5, p.1-9, 2015.

BIOT, F. V.; LOPEZ, M. M.; POYOT, T.; NEULAT-RIPOLL, F.; LIGNON, S.; CACLARD, A.; THIBAUT, F. M.; PEINNEQUIN, A.; PAGES, J. M. Interplay between three rnd efflux pumps in doxycycline-selected strains of Burkholderia thailandensis. *PLoS ONE*, v. 8, p. 1- 11, 2013.

BOCHKAREVA, O.O; MOROZ, E.V; DAVYDOV, I.I; GELFAND, M.S. Genome rearrangements and selection in multi-chromosome bacteria Burkholderia spp. *BMC Genomics*. V.19, p.2-17, 2018.

BOSE S.K; CHAUHAN M; DHINGRA N; CHHIBBER S; HARJAI K. Terpinen-4-ol attenuates quorum sensing regulated virulence factors and biofilm formation in Pseudomonas aeruginosa. *Future Microbiology*. v.3, p.11-24, 2020.

BRENNER, D.J; KRIEG, N.R; AND STALEY, J.T. Bergey’s Manual of Systematic Bacteriology. *Second Edition*., v.2, p.41-79, 2005.

BRILHANTE, R.S.N; BANDEIRA, T.J.P.G; CORDEIRO, R.A; GRANGEIRO, T.B; LIMA, R.A.C; RIBEIRO, J.F; CASTELO-BRANCO, D.S.C.M; RODRIGUES, J.L.N; COELHO, I.C.B; MAGALHAES, F.G; ROCHA, M.F.G; SIDRIM, J.J.C. Clinical-epidemiological features of 13 cases of melioidosis in Brazil. *Journal of Clinical Microbiology*, v.50, p.3349–52, 2012a.

BRILHANTE, R.S.N; VALENTE, L.G.A; ROCHA, M.F.G; BANDEIRA, T.J.P.G; CORDEIRO, R.A; LIMA, R.A.C; LEITE, J.J.G; RIBEIRO, J. F; PEREIRA, J. F; CASTELO-BRANCO, D.S.C.M; MONTEIRO, A.J; SIDRIM, J.J. Sesquiterpene farnesol contributes to increased susceptibility to β -lactams in strains of *Burkholderia pseudomallei*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v.56, p.2198-2200, 2012b.

BURTINICK, M.N; BRETT, P.J; DESHAZER, D. Proteomic analysis of the *Burkholderia pseudomallei* type II secretome reveals hydrolytic enzymes, novel proteins, and the deubiquitinase TssM. *Infections Immunity*. v.82, p.3214–3226, 2014.

BURTINICK, M.N; BRETT, P.J; NAIR, V; WARAWA, J.M; WOODS, D.E; GHERARDINI, F.C. *Burkholderia pseudomallei* type III secretion system mutants exhibit delayed vacuolar escape phenotypes in RAW 264.7 murine macrophages. *Infection Immunity*. v.76, p.2991–3000, 2008.

CAMPOS, C.G; BYRD, M.S. & COTTER, P.A. Functional characterization of *Burkholderia pseudomallei* trimeric autotransporters. *Infection Immunity*. v.81, p.2788–2799, 2013.

CAMPOS, C.G; BYRD, M.S; COTTER, P.A. Functional characterization of *Burkholderia pseudomallei* trimeric autotransporters. *Infections Immunity*, v.81, p.2788–2799, 2013.

CASTELO-BRANCO, D.S.C.M., RIELLO, G.B., VASCONCELOS, D.C., GUEDES, G.M.M., SERPA, R., BANDEIRA, T.J.P.G., MONTEIRO, A.J., CORDEIRO, R.A., ROCHA, M.F.G., SIDRIM, J.J.C., BRILHANTE, R.S.N. Farnesol increases the susceptibility of *Burkholderia pseudomallei* biofilm to antimicrobials used to treat melioidosis. *Journal of Applied Microbiology*, v. 120, p. 600-606, 2016.

Centers for Disease Control and Prevention. Possession, use, and transfer of select agents and toxins; *Biennial review. Final rule. Federation Register*, v.77, p.61083–61115, 2012.

CERESA C, TESSAROLO F, MANIGLIO D, TAMBONE E, CARMAGNOLA I, FEDELI E, CAOLA I, NOLLO G, CHIONO V, ALLEGRONE G, RINALDI M, FRACCHIA L. Medical-Grade Silicone Coated with Rhamnolipid R89 Is Effective against *Staphylococcus spp.* Biofilms. **Molecules**, v.25, p.21-24, 2019.

CHAN, Y. Y.; CHUA, K. L. The *Burkholderia pseudomallei* BpeAB-OprB efflux pump: expression and impact on quorum sensing and virulence. **Journal of Bacteriology**, v. 187, p. 4707-4719, 2005.

CHAN, Y.Y; BIAN, H.S; TAN, T.M.C; MATTMANN, M.E; GESKE, G.D; IGARASHI, J; HATANNO, T; SUGA, H; BLACKWELL, H.E; CHUA, K.L. Control of quorum sensing by a *Burkholderia pseudomallei* multidrug efflux pump. **Journal of Bacteriology**, v. 189, p. 4320-4324, 2007a.

CHANTRATITA, N; WUTHIEKANUN, V; LIMMATHUROTSAKUL, D; VESARATCHAVEST, M; THANWISAI, A; AMORNCHAI, P; TUMAPA, S; FEIL, E.J; DAY, N.P; PEACOCK, S.J. Genetic diversity and microevolution of *Burkholderia pseudomallei* in the environment. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, 2, e182, 2008.

CHEN, P.S; CHEN, Y.S; LIN, H.H; LIU, P.J; NI, W.F; HSUEH, P.T; LIANG, S.H; CHEN, C; CHEN, Y.L. Airborne Transmission of Melioidosis to Humans from Environmental Aerosols Contaminated with *B. pseudomallei*. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v.6, p.38-34, 2015.

CHEN, P.S; CHEN, Y.S; LIN, H.H; LIU, P.J; NI, W.F; HSUEH, P.T; LIANG, S.H; CHEN, C; CHEN, Y.L. Airborne transmission of melioidosis to humans from environmental aerosols contaminated with *B. pseudomallei*. **PLoS Neglected Tropical Diseases**. v.9, p. 273–281, 2015.

CHEN, Y.S; LIN, H.H; UM, J.J; CHIANG, C.S; CHEN, C.H; BUU, L.M; LIN, Y.E; CHEN, Y.L. Distribution of melioidosis cases and viable *Burkholderia pseudomallei* in soil: Evidence for emerging melioidosis in Taiwan. **Journal of Clinical Microbiol.** v.48, p.1432–1434, 2010.

CHENG, A.C. & CURRIE, B.J. Melioidosis: epidemiology, pathophysiology, and management. **Clinical Microbiology Review**, v.18, p.383–416, 2005.

CHENG, A.C; O'BRIEN, M; FREEMAN, K; LUM, G; CURRIE, B.J. Indirect hemagglutination assay in patients with melioidosis in northern Australia. **The American Journal of Tropical Medicine Hygiene**, v.2, p-330-4, 2006.

CHEWAPREECHA, C; MATHER, A.E; HARRIS, S.R; HUNT, M; HOLDEN, M.T.G; CHAICHANA, C; WUTHIEKANUN, V; DOUGAN, G; DAY, N.P.J; LIMMATHUROTSAKUL, D; PARKHILL, J; PEACOCK, S.J. Genetic variation associated with infection and the environment in the accidental pathogen *Burkholderia pseudomallei*. *Communications Biology*, v.2, p.428-35, 2019.

CHEWAPREECHA; C; HOLDEN, M.T; VEHKALA, M; VÄLIMÄKI, N; YANG, Z; HARRIS, S.R; MATHER, A.E; TUANYOK, A; DE SMET, B; LE HELLO, S; BIZET, C; MAYO, M; WUTHIEKANUN, V; LIMMATHUROTSAKUL, D; PHETSOUVANH, R; SPRATT, B.G; CORANDER, J; KEIM, P; DOUGAN, G; DANCE, D.A; CURRIE, B.J; PARKHILL, J; PEACOCK, S.J. Global and regional dissemination and evolution of *Burkholderia pseudomallei*. *Nature Microbiology*, v.2, p.162-63, 2017.

CHUA, K.L; CHAN, Y.Y & GAN, Y.H. Flagella are virulence determinants of *Burkholderia pseudomallei*. *Infections Immunity*, v.71, p.1622–1629, 2003.

CHUAYGUD, T; TUNGPRADABKUL, S; SIRISINHA, S; CHUA, K.L. & UTAISINCHAROEN, P. A role of *Burkholderia pseudomallei* flagella as a virulent factor. *Transation of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygieny*. v.102, p.140–S144, 2008.

COSTERTON, J.W; MCCOWAN, R.P; CHENG, K.J; BAILEY, C.B; COSTERTON, J.W. Adhesion of bacteria to epithelial cell surfaces within the reticulo-rumen of cattle. *Applied Environmental Microbioly*, v.1, p.149-55, 1978.

CURRIE, B.J. Melioidosis: evolving concepts in epidemiology, pathogenesis, and treatment. *Seminar in Respirator Critical Care of Medicine*, v.36, p.111–125, 2015.

CURRIE, B.J; WARD, L; CHENG, A.C. The epidemiology and clinical spectrum of melioidosis: 540 cases from the 20 year Darwin prospective study. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, v.11, p.900-9, 2010.

DANCE, D.A. Melioidosis: The tip of the iceberg? *Clinical Microbiology Review*.v.4, p.52-60, 1991.

DAVID, J; BELL, R.E. & CLARK, G.C. Mechanisms of disease: host-pathogen interactions between *Burkholderia* species and lung epithelial cells. *Frontier in Cellular and Infection Microbiology*, v.5, p.80-90, 2015.

DELCARU, C; ALEXANDRU, I; PODGOREANU, P; GROSU, M; STAVROPOULOS, E; CHIFIRIUC, M.C; LAZAR, V. Microbial Biofilms in Urinary Tract Infections and Prostatitis: Etiology, Pathogenicity, and Combating strategies. *Pathogens*, v.4, p.65-73, 2016.

DERYABIN D; GALADZHIEVA A; KOSYAN D; DUSKAEV G. Plant-Derived Inhibitors of AHL-Mediated Quorum Sensing in Bacteria: **Modes of Action. Intitute Journal of Molecules Science.** v.22, p.55-88. 2019.

DINGLE, T.C; BUTLER-WU, S.M; ABBOTT, A.N. Accidental exposure to Burkholderia pseudomallei in the laboratory in the era of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *Journal of Clinical Microbiology*, v.9, p.3490-1. 2014.

DONG, S; WU, L; LONG, F; WU, Q; LIU, X; PEI, H; XU, K; LU, Y; WANG, Y; LIN, Y; XIA, Q. The prevalence and distribution of Burkholderia pseudomallei in rice paddy within Hainan, China. *Acta Tropical*. v.187, p.165-168.2018.

ENG SA, NATHAN S. Curcumin rescues Caenorhabditis elegans from a Burkholderia

ESSEX-LOPRESTI, A.E; BODDEY, J.A; THOMAS, R; SMITH, M.P; HARTLEY, M.G; ATKINS, T; BROWN, N.F; TSANG, C.H; PEAK, I.R; HILL, J; BEACHAM, I.R; TITBALL, R.W. A type IV pilin, PilA, Contributes To Adherence of Burkholderia pseudomallei and virulence in vivo. *Infection Immunity*, v.2, p.1260-4, 2005.

FLEMMING, H.C; WINGENDER, J. The biofilm matrix. *Nature Review Microbiology*, v.9, p.623-33, 2010.

FONG, S. M; WONG, K. J; FUKUSHIMA, M; YEO, T. W. Thalassemia major is a major risk factor for pediatric melioidosis in Kota Kinabalu, Sabah, Malaysia. *Clinical Infection Diseases*, v.60, p.1802–1807, 2015.

FU, Z; LIN, Y; WU, Q; XIA, Q. Pediatric suppurative parotitis caused by Burkholderia pseudomallei. *Journal Venomous Animal Toxins Including Tropical Diseases*. v.9, p.22-31. 2016.

GAL, D; MAYO, M; SMITH-VAUGHAN, H; DASARI, P; MCKINNON, M; JACUPS, S.P; URQUHART, A.I; HASSELL, M; CURRIE, B.J. Contamination of hand wash detergent linked to occupationally acquired melioidosis. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v.3, p.360-2, 2004.

GALYOV, E.E; BRETT, P.J; DESHAZER, D. Molecular insights into *Burkholderia pseudomallei* and *Burkholderia mallei* pathogenesis. *Annul Review Microbiology*, v.64, p.495-517, 2010.

GAMAGE, A.M; SHUI, G; WENK, M.R; CHUA, K.L. N-Octanoylhomoserine lactone signaling mediated by the BpsI–BpsR quorum sensing system plays a major role in biofilm formation of *Burkholderia pseudomallei*. *Microbiology*, v. 157, p.1176-1186, 2011.

GARCIA-CONTRERAS R. Is Quorum Sensing Interference a Viable Alternative to Treat *Pseudomonas aeruginosa* Infections? *Frontier Microbiology*, v.7, p.154-9, 2016.

GARCÍA-CONTRERAS R; PERÉZ-ERETZA B; JASSO-CHÁVEZ R; LIRA-SILVA E; ROLDÁN-SÁNCHEZ J.A; GONZÁLEZ-VALDEZ A; SOBERÓN-CHÁVEZ G; CORIA-JIMÉNEZ R; MARTÍNEZ-VÁZQUEZ M; ALCARAZ LD; MAEDA T; WOOD T.K. High variability in quórum quenching and growth inhibition by furanone C-30 in *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates from cystic fibrosis patients. *Pathogens Diseases*. v.6, p.20-40. 2015.

GÖHLER, A; TRUNG, T.T; HOPF, V; KOHLER, C; HARTLEIB, J; WUTHIEKANUN, V; PEACOCK, S.J; LIMMATHUROTSAKUL, D; TUANYOK, A; STEINMETZ, I. Multitarget Quantitative PCR Improves Detection and Predicts Cultivability of the Pathogen *Burkholderia pseudomallei*. *Applied and Environmental Microbioly*, v.8, p.03212-16, 2017.

GOMES, F; TEIXEIRA, P; CERCA, N; AZEREDO, J; OLIVEIRA, R. Effect of CCCP on structure and composition of *Staphylococcus epidermidis* biofilm matrix. *Current Microbiology*, v. 63, p. 354–359, 2011.

GONG, L; CULLINANE, M; TREERAT, P; RAMM, G; PRESCOTT, M; ADLER, B; BOYCE, J.D; DEVENISH, R.J. The *Burkholderia pseudomallei* type III secretion system and BopA are required for evasion of LC3-associated phagocytosis. *PLoS ONE*, v.6, p.152-78, 2011.

GOSHORN R.K. Recrudescence pulmonary melioidosis. A case report involving the so-called 'Vietnamese time bomb'. *Indiana Medicine*, v.3, p.247-9, 1987.

HANTRAKUN, V; RONGKARD, P; OYUCHUA, M; AMORNCHAI, P; LIM, C; WUTHIEKANUN, V; DAY, N.P; PEACOCK, S.J; LIMMATHUROTSAKUL, D. Soil Nutrient Depletion Is Associated with the Presence of *Burkholderia pseudomallei*. *Applie Environmental Microbiology*, v.24, p.7086-7092, 2016.

HARRIS, P.N; KETHEESAN, N; OWENS, L; NORTON, R.E. Clinical features that affect indirect-hemagglutination-assay responses to *Burkholderia pseudomallei*. *Clinical Vaccine Immunology*, v.6, p.924-30, 2009.

HARTMAN, G. C., KEITH, K., CROSSETT, B., TITBALL, R. W., BROWN, K. A. & WALSH, T. R. Identification and characterisation of a class A and class C β -lactamase and their AmpR regulators in *Burkholderia pseudomallei*. American Society for Microbiology, Washington, DC, USA. 2001. v.3, p.14-96, 2001.

HAYDEN, H.S; LIM, R.; BRITTNACHER, M.J; SIMS, E.H; RAMAGE, E.R; FONG, C; WU, Z; CRIST, E; CHANG, J; ZHOU, Y; RADEY, M; ROHMER, L; HAUGEN, E; GILLETT, W; WUTHIEKANUN, V; PEACOCK, S. J; KAUL, R; MILLER, S.I; MANOIL, C; JACOBS, M. A. Evolution of *Burkholderia pseudomallei* in recurrent melioidosis. **Plos One**, v.7, p.365-07, 2012.

HEMARAJATA, P; BAGHDADI, J.D; HOFFMAN, R; HUMPHRIES, R.M. *Burkholderia pseudomallei*: Challenges for the Clinical Microbiology Laboratory. *Journal of Clinical Microbiology*, v.12, p.2866-2873, 2016.

HO, C.C; LAU, C.C; MARTELLI, P; CHAN, S.Y; TSE, C.W; WU, A.K; YUEN, K.Y; LAU, S.K; WOO, P.C. Novel pan-genomic analysis approach in target selection for multiplex PCR identification and detection of *Burkholderia pseudomallei*, *Burkholderia thailandensis*, and *Burkholderia cepacia* complex species: a proof-of-concept study. *Journal of Clinical Microbiology*, v.3, p.814-21, 2011.

HOLDEN, M.T; TITBALL, R.W; PEACOCK, S.J; CERDEÑO-TÁRRAGA, A.M; ATKINS, T; CROSSMAN, L.C; PITT, T; CHURCHER, C; MUNGALL, K; BENTLEY, S.D; SEBAIHIA, M; THOMSON, N.R; BASON, N; BEACHAM, I.R; BROOKS, K; BROWN, K.A; BROWN, N.F; CHALLIS, G.L; CHEREVACH, I; CHILLINGWORTH, T; CRONIN, A; CROSSETT, B; DAVIS, P; DESHAZER, D; FELTWELL, T; FRASER, A; HANCE, Z; HAUSER, H; HOLROYD, S; JAGELS, K; KEITH, K.E; MADDISON, M; MOULE, S; PRICE, C; QUAIL, M.A; RABBINOWITSCH, E; RUTHERFORD, K; SANDERS, M; SIMMONDS, M; SONGSIVILAI, S; STEVENS, K; TUMAPA, S; VESARATCHAVEST, M; WHITEHEAD, S; YEATS, C; BARRELL, B.G; OYSTON, P.C; PARKHILL, J. Genomic plasticity of the causative agent of melioidosis, *Burkholderia pseudomallei*. *Proceeding of the National Academy Science of Unite State of American*, v.39, p.14240-5, 2004.

HOREV, B.; KLEIN, M. I.; HWANG, G.; LI, Y.; KIM, D.; KOO, H.; BENOIT, D. S. W. pHactivated nanoparticles for controlled topical delivery of farnesol to disrupt oral biofilm virulence. *ACS Nano*, p. 1-45, 2015.

HSUEH P.T.; HUANG W.T.; HSUEH H.K.; CHEN Y.L.; CHEN Y.S. Transmission Modes of Melioidosis in Taiwan. *Tropical Medicine and Infection Diseases*. v.3, p.10-26, 2018.

IKONOMIDIS A; TSAKRIS A; KANELLOPOULOU M; MANIATIS A.N; POURNARAS S. Effect of the proton motive force inhibitor carbonyl cyanide-m-chlorophenylhydrazone (CCCP) on *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. **Letters in Applied Microbiology**, v. 10, P. 298–302, 2008.

INGLIS, T.J; HEALY, P.E; FREMLIN, L.J; GOLLEDGE, C.L. Use of matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry analysis for rapid confirmation of *Burkholderia pseudomallei* in septicemic melioidosis. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.6, p.1039-42, 2012.

INGLIS, T.J; ROLIM, D.B; RODRIGUEZ, J.L. Clinical guideline for diagnosis and management of melioidosis. **Revista do Instituto de Medicina Tropical do São Paulo**, v.1, p.1-4, 2006.

KAESTLI, M; MAYO, M; HARRINGTON, G; WARD, L; WATT F; HILL, JV; CHENG, AC; CURRIE, BJ. Landscape changes influence the occurrence of the melioidosis bacterium *Burkholderia pseudomallei* in soil in Northern Australia. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 3, p. 364, 2009.

KAESTLI, M; RICHARDSON, L.J; COLMAN, R.E; TUANYOK, A; PRICE E.P; BOWERS, J.R; MAYO, M; KELLEY, E; SEYMOUR, M.L; SAROVICH, D.S; PEARSON, T; ENGELTHALER, D.M; WAGNER, D.M; KEIM, P.S; SCHUPP, J.M; CURRIE, B.J. Comparison of TaqMan PCR assays for detection of the melioidosis agent *Burkholderia pseudomallei* in clinical specimens. **Journal of Clinical Microbiology**, v.6, p.2059-62, 2012.

KALI A, BHUVANESHWAR D; PRAVIN M; CHARLES V; SEETHA K.S. Antibacterial synergy of curcumin with antibiotics against biofilm producing clinical bacterial isolates. **Journal of Basic and Clinical Pharmacy**, v.7, p.95-100. 2016.
KARGER, A; STOCK, R; ZILLER, M; ELSCHNER, M.C; BETTIN, B; MELZER, F; MAIER, T; KOSTRZEWA, M; SCHOLZ, H.C; NEUBAUER, H; TOMASO, H. Rapid identification of *Burkholderia mallei* and *Burkholderia pseudomallei* by intact cell Matrix-assisted Laser Desorption/Ionisation mass spectrometric typing. **BMC Microbiology**, v.10, p.220-229, 2012.

KATANGWE, T; PURCELL, J; BAR-ZEEV, N; DENIS, B; MONTGOMERY, J; ALAERTS, M; HEYDERMAN, R.S; DANCE, D.A.B; KENNEDY, N; FEASEY, N; MOXON, C.A. Human Melioidosis, Malawi, 2011. **Emerging Infectious Diseases**, v.19, p.14-20, 2011.

KATANGWE, T; PURCELL, J; BAR-ZEEV, N; DENIS, B; MONTGOMERY, J; ALAERTS, M; HEYDERMAN, R.S; DANCE, D.A; KENNEDY, N; FEASEY, N; MOXON, C.A. Human melioidosis, Malawi, 2011. **Emerging Infectious Diseases**, v.6, p.981-4, 2013.

KINOSHITA, R.E. Epidemiology of melioidosis in an oceanarium: a clinical, environmental & molecular study. *Thesis, University of Hong Kong*, v.10, p.57-74, 2003.

KOH, S. F; TAY, S.T; PUTHUCHEARY, S.D. Colonial morphotypes and biofilm forming ability of *Burkholderia pseudomallei*. *Tropical Biomedicine*, v. 30, p.428–433, 2013.

KONEMAN, E; WASHINGTON, W.J; ALLEN, S; JANDA, W; PROCOP, G; SCHRECKENBERGER, P; WOODS, G. Diagnóstico Microbiológico: Texto E Atlas Colorido. *Edited by São Paulo: Guanabara*, p.1565, 2008.

KOO, H; ALLAN, RN; HOWLIN, R.P; STOODLEY, P; HALL-STOODLEY, L. Targeting microbial biofilms: current and prospective therapeutic strategies. *Nature Reviews Microbiol*, v.12, p.740-755, 2017.

KRISHNAMOORTHY G; JON W; WEEK S; ZHANG Z; COURTNEY E; CHANDLE R; XUE H; HERBERT P; SCHWEIZE R; ROBERT K; ERNS T; HELEN I; ZGURSKAY A. Efflux Pumps of *Burkholderia thailandensis* Control the Permeability Barrier of the Outer Membrane. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v.8, p.103-145, 2019.

KUMAR, A; ALAM, A; RANI, M; EHTESHAM, N.Z; HASNAIN, S.E. Biofilms: Survival and defense strategy for pathogens. *International Journal of Medical Microbiology*, v. 307, p. 481-489, 2017.

LAFONTAINE, E.R; BALDER, R; MICHEL, F & HOGAN, R. J. Characterization of an autotransporter adhesin protein shared by *Burkholderia mallei* and *Burkholderia pseudomallei*. *BMC Microbiology*. v.14, p.92-8, 2014.

LASARRE, B; FEDERLE, M.J. Exploiting quorum sensing to confuse bacterial pathogens. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, v. 77, p.73-111, 2013.

LAU, S.K; CHAN, S.Y; CURREEM, S.O; HUI, S.W; LAU, C.C; LEE, P; HO, C.C; MARTELLI, P; WOO, P.C. *Burkholderia pseudomallei* in soil samples from an oceanarium in Hong Kong detected using a sensitive PCR assay. *Emerging Microbes Infectology*, v.10, p.150-69, 2014.

LAU, S.K; CHAN, S.Y; CURREEM, S.O; HUI, S.W; LAU, C.C; LEE, P; HO, C.C; MARTELLI, P; WOO, P.C. *Burkholderia pseudomallei* in soil samples from an oceanarium in Hong Kong detected using a sensitive PCR assay. *Emerging Microbes Infections*, v.10, p.60-69, 2014.

LAU, S.K; TANG, B.S; CURREEM, S.O; CHAN, T.M; MARTELLI, P; TSE, C.W; WU, A.K; YUEN, K.Y; WOO, P.C. Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for rapid identification of *Burkholderia pseudomallei*: importance of expanding databases with pathogens endemic to different localities. *Journal of Clinical Microbiology*, v.9, p.3142-3, 2012.

LAZARET, A.N.R; DEAN, R.E; SAINT, R.J; STEVENS, M.P; PRIOR, J.L; ATKINS, T.P; GALYOV, E.E. Identification of a predicted trimeric autotransporter adhesin required for biofilm formation of *Burkholderia pseudomallei*. **Plos One**, v. 8, p.76-94, 2013.

LEIMAN, P.G; BASLER, M; RAMAGOPAL, U.A; BONANNO, J.B; SAUDER, J.M; PUKATZKI, S; BURLEY, S.K; ALMO, S.C; MEKALANOS, J.J. Type VI secretion apparatus and phage tail-associated protein complexes share a common evolutionary origin. *Proceeding and National Academic Science of the United States of American*, v.11, p.4154-9, 2009.

LI J; LIU W; REN R; XU D; LIU C; WANG B; WANG A. Weakened adhesion force between extracellular polymeric substances of waste activated sludge caused by rhamnolipid leading to more efficient carbon release. **Science Total Environmental**. v.692, p.892-902, 2019.

LIMMATHUROTSAKUL, D; GOLDING, N; DANCE, D.A; MESSINA, J.P; PIGOTT, D.M; MOYES, C.L; ROLIM, D.B; BERTHERAT, E; DAY, N.P; PEACOCK, S.J; HAY, S.I. Predicted global distribution of *Burkholderia pseudomallei* and burden of melioidosis. *Nature Microbiology*; v.11, p.150-80, 2016.

LIMMATHUROTSAKUL, D; JAMSEN, K; ARAYAWICHANONT, A; SIMPSON, J.A; WHITE, L.J; LEE, S.J; WUTHIEKANUN, V; CHANTRATITA, N; CHENG, A; DAY, N.P; VERZILLI, C; PEACOCK, S.J. Defining the true sensitivity of culture for the diagnosis of melioidosis using Bayesian latent class models. **PLoS One**. v.5, p.124-85, 2010.

LIMMATHUROTSAKUL, D; KANOKSIL, M; WUTHIEKANUN, V; KITPHATI, R; DESTAVOLA, B; DAY, N.P; PEACOCK, S.J. Activities of daily living associated with acquisition of melioidosis in northeast Thailand: a matched case-control study. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v.2-p.2072-89, 2013.

LIMMATHUROTSAKUL, D; PAEYAO, A; WONGRATANACHEEWIN, S; SAIPROM, N; TAKPHO, N; THAIPADUNGPANIT, J; CHANTRATITA, N; WUTHIEKANUN, V; DAY, N.P; PEACOCK, S.J. Role of *Burkholderia pseudomallei* biofilm formation and lipopolysaccharide in relapse of melioidosis. **Clinical Microbiology Infection**.v.20, p.854-6, 2014.

LIMMATHUROTSAKUL, D; WONGSUVAN, G; AANENSEN, D; NGAMWILAI, S; SAIPROM, N; RONGKARD, P; THAIPADUNGPANIT, J; KANOKSIL, M; CHANTRATITA, N; DAY, N.P; PEACOCK, S.J. Melioidosis caused by *Burkholderia pseudomallei* in drinking water, Thailand, 2012. **Emerging Infections Diseases**, v.2, p.265-8, 2012.

MAHARJAN, B; CHANTRATITA, N; VESARATCHAVEST, M; CHENG, A; WUTHIEKANUN, V; CHIERAKUL, W; CHAOWAGUL, W; DAY, N.P; PEACOCK, S.J. Recurrent melioidosis in patients in northeast Thailand is frequently due to reinfection rather than relapse. *Journal of Clinical Microbiology*, v.12, p.6032-4, 2005.

MALAKHOVA, M.V; VERESHCHAGIN, V.A; IL'INA, E.N; GOVORUN, V.M; FILIMONOVA, O.I.U; GRUDININA, S.A; SIDORENKO, S.V. MALDI-ToF mass-spectrometry in analysis of genetically determined resistance of *Streptococcus pneumoniae* to fluoroquinolones. *Antibiotiki Khimioterapia*. v.2, p.10-7, 2007.

MCLEOD, C; MORRIS, P.S; BAUERT, P.A; KILBURN, C.J; WARD, L.M; BAIRD, R.W; CURRIE, B.J. Clinical presentation and medical management of melioidosis in children: a 24-year prospective study in the Northern Territory of Australia and review of the literature. *Clinical Infectious Diseases*, v.1, p.21-6, 2015.

MENICHINI, M; LARI, N. & RINDI, L. Effect of efflux pump inhibitors on the susceptibility of *Mycobacterium avium* complex to clarithromycin. *The Journal of Antibiotic*, v.6, p.102-13, 2019.

MERRITT, A.J; PECK, M; INGLIS, T.J.J. Cutaneous melioidosis cluster caused by contaminated wound irrigation fluid. *Emerging Infection Diseases*, v.22, p-1420–1427 2016.

MIMA T, SCHWEIZER HP. The BpeAB-OprB efflux pump of *Burkholderia pseudomallei* 1026b does not play a role in quorum sensing, virulence factor production, or extrusion of aminoglycosides but is a broad-spectrum drug efflux system. *Antimicrobiol Agents Chemother*. v.8, p.3113-20, 2010.

MIMA, T; SCHWEIZER, H.P. The bpeab-oprb efflux pump of *Burkholderia pseudomallei* 1026b does not play a role in quorum sensing, virulence factor production, or extrusion of aminoglycosides but is a broad-spectrum drug efflux system. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 54, p. 3113-3120, 2010.

MYERS, N.D; CHANTRATITA, N; BERRINGTON, W.R; CHIERAKUL, W; LIMMATHUROTSAKUL, D; WUTHIEKANUN; V; ROBERTSON, J.D; LIGGITT, H.D; PEACOCK, S.J; SKERRETT, S.J; WEST, T.E. The role of NOD2 in murine and human melioidosis. *Journal of Immunology*, v.1, p.300-7, 2014.

NGAUY, V; YAN, L; LEE, S; CRAWFORD, G. Cutaneous melioidosis in a man who was taken as a prisoner of war by the Japanese during world war II. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 43, p. 970–972, 2005.

NIUMSUP P; WUTHIEKANUN V. Cloning of the class D β -lactamase gene from *Burkholderia pseudomallei* and studies on its expression in ceftazidime-susceptible and -resistant strains. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.50, p.445-455 2002.

OOI, W.F; ONG, C; NANDI, T; KREISBERG, J.F; CHUA, H.H; SUN, G; CHEN, Y; MUELLER, C; CONEJERO, L; ESHAGHI, M; ANG, R.M; LIU, J; SOBRAL, B.W; KORBSRISATE, S; GAN, Y.H; TITBALL, R.W; BANCROFT, G.J; VALADE, E; TAN, P. The condition-dependent transcriptional landscape of *Burkholderia pseudomallei*. **PLoS Genetic**, v.9, p.100379-85, 2013.

PAN, J; HU, J; LIU, B; LI, J; WANG, D; BU, C; WANG, X; XIAO, K; LIANG, S; YANG, J; HOU, H. Enhanced quorum sensing of anode biofilm for better sensing linearity and recovery capability of microbial fuel cell toxicity sensor. **Environmental Research**, v.1, p.108-104, 2019.

PAPENFORT, K; BASSLER, B.L. Quorum sensing signal-response systems in Gram-negative bacteria. **Nature Review Microbiology**, v.9, p.576-88, 2016.

PERCIVAL, S.L; THOMAS, J; LINTON, S; OKEL, T; CORUM, L; SLONE, W. The antimicrobial efficacy of silver on antibiotic-resistant bacteria isolated from burn wounds. **International Wound Journal**, v.5, p.488-93, 2012.

PHEWKLIANG, A; WONGRATANACHEEWIN, S. & CHAREONSUDJAI, S. Role of *Burkholderia pseudomallei* in the invasion, replication and induction of apoptosis in human epithelial cell lines. **Southeast Asian Journal of Tropical Medicina and Public Health**, v.41, p.1164–1176, 2010.

PITT, T. L; TRAKULSOMBOON, S; DANCE, D.A.B. Recurrent melioidosis: possible role of infection with multiple strains of *Burkholderia pseudomallei*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 45, p. 680-681, 2007. *pseudomallei* infection. **Frontier Microbiology**, v,10, p.62-90. 2015.

PUMPUANG, A; CHANTRATITA, N; WIKRAIPHAT, C; SAIPROM, N; DAY, N.P; PEACOCK, S.J; WUTHIEKANUN, V. Survival of *Burkholderia pseudomallei* in distilled water for 16 years. **Transaction of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v.10, p.598-600, 2011.

RACHLIN, A; DITTRICH, S; PHOMMASONE, K; DOUANGNOUVONG, A; PHETSOUVANH, R; NEWTON, P.N; DANCE, D.A.B. Investigation of Recurrent Melioidosis in Lao People's Democratic Republic by Multilocus Sequence Typing. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.6, p.1208-1211, 2016.

RECKSEIDLER-ZENTENO, S.L; DEVINNEY, R; WOODS, D.E. The Capsular Polysaccharide of. *Infection and Immunity*, v. 73, p. 1106–1115, 2005.

RHOLL, D.A; PAPP-WALLACE, K.M; TOMARAS, A.P; VASIL, M.L; BONOMO, R. A; SCHWEIZER, H.P. Molecular investigations of PenA-mediated β -lactam resistance in *Burkholderia pseudomallei*. *Frontiers in Microbiology*, v.2, p.139-43, 2011.

ROLIM, D.B; VILAR, D.C; SOUSA, A.Q; MIRALLES, I.S; DE OLIVEIRA, D.C; HARNETT, G; O'REILLY, L; HOWARD, K; SAMPSON, I; INGLIS, T.J. Melioidosis, northeastern Brazil. *Emerging Infection Diseases*, v.9, p.1458-60, 2005.

RUTHERFORD, S.T; BASSLER, B.L. Bacterial quorum sensing: its role in virulence and possibilities for its control. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, v.11, p.124-27, 2012.

SALAM, A.P; KHAN, N; MALNICK, H, KENNA, D.T; DANCE, D.A; KLEIN, J.L. Melioidosis acquired by traveler to Nigeria. *Emerging Infections Diseases*. v.7, p.1296-8, 2011.

SAROVICH, D. S; PRICE, E. P; VON SCHULZE, A.T; COOK, J.M; MAYO, M; WATSON, L.M; RICHARDSON, L; SEYMOUR, M.L; TUANYOK, A; ENGELTHALER, D.M; PEARSON, T; PEACOCK, S.J; CURRIE, B.J; KEIM, P; WAGNER, D.M. Characterization of ceftazidime mechanisms in clinical isolates of *Burkholderia pseudomallei* from Australia. *Plos One*, v.7, e30789, 2012.

SAROVICH, D.S; PRICE, E.P; WEBB, J.R; WARD, L.M; VOUTSINOS, M.Y; TUANYOK, A; MAYO, M; KAESTLI, M; CURRIE, B.J. Variable virulence factors in *Burkholderia pseudomallei* (melioidosis) associated with human disease. *PLoS One*, 3, p.91682, 2014.

SAWASDIDOLN, C.; TAWEECHAI SUPAPONG, S.; SERMSWAN, R. W.; TATTAWASART, U.; TUNGPRADABKUL, S.; WONGRATANACHEEWIN, S. Growing *Burkholderia pseudomallei* in biofilm stimulating conditions significantly induces antimicrobial resistance. *PLoS One*, v. 5, p. 1–10, 2010.

SCHWEIZER, H. P. Mechanisms of Antibiotic resistance in *Burkholderia pseudomallei*: implications for treatment of melioidosis. *Future Microbiology*, v. 7, p. 1389–1399, 2012.

SHARIF D.I; GALLON J; SMITH C.J; DUDLEY E. Quorum sensing in Cyanobacteria: N-octanoyl-homoserine lactone release and response, by the epilithic colonial cyanobacterium *Gloeotheca* PCC6909. *ISME Journal*, v.12, p.1171-82, 2008.

SIDRIM, J. J. C.; VASCONCELOS, D. C.; RIELLO, G. B.; GUEDES, G. M. M.; SERPA, R.; BANDEIRA, T. J. P. G.; MONTEIRO, A. J.; CORDEIRO, R. A.; CASTELO-BRANCO, D. S. C. M.; ROCHA, M. F. G.; BRILHANTE, R. S. N. Promethazine improves antibiotic efficacy and disrupts biofilms of *Burkholderia pseudomallei*. *Biofouling*, v. 33, pp. 88-97, 2017.

SILVA, E.B. & DOW, S.W. Development of *Burkholderia mallei* and pseudomallei vaccines. *Frontier Cellular Infection Microbiology*, v.3, p.10-19, 2013.

SINGH, V.K; MISHRA, A; JHA, B. Anti-quorum Sensing and Anti-biofilm Activity of Delftia tsuruhatensis Extract by Attenuating the Quorum Sensing-Controlled Virulence Factor Production in Pseudomonas aeruginosa. *Frontier Cellular Infectious Microbiology*, v.7, p.337-406, 2017.

SINHA, D; PANDEY, S; SINGH, R; TIWARI, V; SAD, K; TANDON, V. Synergistic efficacy of Bisbenzimidazole and Carbonyl Cyanide 3 Chlorophenylhydrazone combination againstMDR bacterial strains. *Scientific Reports*, v.7, p.444-419. 2017.

SMITH, M. D; ANGUS, B.J; WUTHIEKANUN, V; WHITE, N.J. Arabinose assimilation defines a nonvirulent biotype of Burkholderia pseudomallei. *Infection and Immunity*, v. 65, p.4319–4321, 1997.

SOLANO, C; ECHEVERZ, M; LASA, I. Biofilm dispersion and quorum sensing. *Current Opinion in Microbiology*, v.18, p.96-104, 2014.

SOOD U; SINGH D.N; HIRA P; LEE J.K; KALIA V.C; LAL R; SHAKARAD M. Rapid and solitary production of mono-rhamnolipid biosurfactant and biofilm inhibiting pyocyanin by a taxonomic outlier Pseudomonas aeruginosa strain CR1. *Journal of Biotechnology*, v.307, p.98-106, 2020.

STANTON A.T; FLETCHER, M.D; KANAGARAYER, L.M.S. Two cases of melioidosis. *Journal of hygiene*, v.23, p.2-18, 1921.

STEPANOVIĆ, S; VUKOVIĆ, D; HOLA, V; DI BONAVENTURA, G; DJUKIĆ, S; CIRKOVIĆ, I; RUZICKA, F. Quantification of biofilm in microtiter plates: overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by staphylococci. *Acta Pathologica Microbiologica et Immunologica Scandinavica*, v.8, p.891-9, 2007.

STEVENS, M.P; WOOD, M.W; TAYLOR, L.A; MONAGHAN, P; HAWES, P; JONES, P.W; WALLIS, T.S; GALYOV, E.E. An Inv/Mxi-Spa-like type III protein secretion system in Burkholderia pseudomallei modulates intracellular behaviour of the pathogen. *Molecular Microbiology*, v.3, p.649-59, 2002.

STONE, J.K; DESHAZER, D; BRETT, P.J. & BURTNICK, M.N. Melioidosis: molecular aspects of pathogenesis. *Expert Review of Anti-Infective Therapy*, v.12, p.1487–1499, 2014.

SU, H.P; YANG, H.W; CHEN, Y.L; FERNG, T.L; CHOU, Y.L; CHUNG, T.C; CHEN, C.H; CHIANG, C.S; KUAN, M.M; LIN, H.H. Prevalence of melioidosis in

the Er-Ren River Basin, Taiwan: Implications for transmission. *Journal of Clinical Microbiology*, v.45, p.2599–2603, 2007.

SUBAKIR, H; CHONG, Y.M; CHAN, Y.F; HASAN, M.S; JAMALUDDIN, M.F.H; PANG, Y.K; PONNAMPALAVANAR, S; OMAR, S.F; SAM, I.C. Selective media and real-time PCR improves diagnosis of melioidosis in community-acquired pneumonia in a low-incidence setting in Kuala Lumpur, Malaysia. *Journal of Medical Microbiol.* v.3, p.231-16, 2019.

SUBAKIR, H; CHONG, Y.M; CHAN, Y.F; HASAN, M.S; JAMALUDDIN, M.F.H; PANG, Y.K; PONNAMPALAVANAR, S; SYED, O; OMAR, S.F; SAM, I.C. Selective media and real-time PCR improves diagnosis of melioidosis in community-acquired pneumonia in a low-incidence setting in Kuala Lumpur, Malaysia. *Journal of Medicine and Microbiology*, v.21, p. 10.1099, 2019.

SUN W; WANG Y; ZHANG W; YING H; WANG P. Novel Surfactant Peptide for Removal of Biofilms. *Biofouling*. S0927-7765(18)30557-5. 2018.

SUN, G.W. & GAN, Y.H. Unraveling type III secretion systems in the highly versatile *Burkholderia pseudomallei*. *Trends Microbiology*, v.18, p.561–568, 2010.

SYBIYA I.S; AGILANDESWARI V.P.P; SYED K; SHUNMUGIAH KARUTHA M; ARUMUGAM P; RAVI V. Antibiofilm and quorum sensing inhibitory potential of *Cuminum cyminum* and its secondary metabolite methyl eugenol against Gram negative bacterial pathogens. *Food Rescher Intitute*, v.45, p.85–92. 2012.

TAURAN, P.M; SENNANG, N; RUSLI, B; WIERSINGA, W.J; DANCE, D; ARIF, M; LIMMATHUROTSAKUL, D. Emergence of Melioidosis in Indonesia. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v.6, p.1160-1163, 2015.

TEERAWATTANASOOK, N; TAURAN, P.M; TEPARRUKKUL, P; WUTHIEKANUN, V; DANCE, D.A.B; ARIF, M; LIMMATHUROTSAKUL, D. Capacity and Utilization of Blood Culture in Two Referral Hospitals in Indonesia and Thailand. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v.4, p.1257-1261, 2017.

THATRIMONTRICHAI, A; MANEENIL, G. Neonatal melioidosis: systematic review of the literature. *Pediatric Infection Diseases Journal*, v.31, p.1195–1197, 2012.

TOESCA, I.J; FRENCH, C.T. & MILLER, J.F. The Type VI secretion system spike protein VgrG5 mediates membrane fusion during intercellular spread by pseudomallei group *Burkholderia* species. *Infection and Immunity*, v.82, p.1436–1444, 2014.

TURNER, P; KLOPROGGE, S; MILIYA, T; SOENG, S; TAN, P; SAR, P; YOS, P; MOORE, C.E; WUTHIEKANUN, V; LIMMATHUROTSAKUL, D; TURNER, C;

DAY, N.P; DANCE, D.A. A retrospective analysis of melioidosis in Cambodian children, 2009-2013. *BMC Infection Diseases*, v.1, p.688-74, 2016.

TYAGI P; SINGH M; KUMARI H; KUMARI A; MUKHOPADHYAY.K. Bactericidal Activity of Curcumin I Is Associated with Damaging of Bacterial Membrane. *PLoS One*, v.3 p.e 0121313. 2015.

VANAPORN, M; WAND, M; MICHELL, S.L; SARKAR-TYSON, M; IRELAND, P; GOLDMAN, S; KEWCHAROENWONG, C; RINCHAI, D; LERTMEMONGKOLCHAI, G; TITBALL, R.W. Superoxide dismutase C is required for intracellular survival and virulence of *Burkholderia pseudomallei*. *Microbiology*, v.8, p.2392-400, 2011.

WAHMAN, S; EMARA, M; SHAWKY, R.M; EL-DOMANY, R.A; ABOULWafa, M.M. Inhibition of quorum sensing-mediated biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa* by a locally isolated *Bacillus cereus*. *Journal of Basic Microbiology*, v.12, p.1406-16, 2015.

WHITE, N. J. Melioidosis. *The Lancet*, v. 361, p.1715–1722, 2003.

WHITMORE, A. An Account of a Glanders-like Disease occurring in Rangoon. *Journal of Hygiene*, v.13, p.1–34, 1913.

WHITMORE, A; KRISHNASWAMI, C.S. A Hitherto Undescribed Infective Disease in Rangoon. *The India Medicine Gazette*, v.7, p.262-267, 1912.

WIERSINGA, W.J; BIRNIE, E; WEEHUIZEN, T.A; ALABI, A.S; HUSON, M.A; HUIS, I.N.T; VELD, R.A; MABALA, H.K; ADZODA, G.K; RACZYNSKI-HENK Y, ESEN M, LELL B, KREMSNER P.G, VISSER C.E, WUTHIEKANUN V, PEACOCK, K.S.J; VAN DER ENDE, A; LIMMATHUROTSAKUL, D; GROBUSCH, M.P. Clinical, environmental, and serologic surveillance studies of melioidosis in Gabon, 2012-2013. *Emerging Infections Diseases*, v.1, p.40-7, 2015.

WIERSINGA, W.J; CURRIE, B.J; PEACOCK, S.J. MELIOIDOSIS. *The New England Journal of Medicine*, v.367, p.1035–1044, 2012.

WIERSINGA, W.J; VIRK, H.S; TORRES, A.G; CURRIE, B.J; PEACOCK, S.J; DANCE, D.A.B; LIMMATHUROTSAKUL, D. Melioidosis. *Nature Reviews Diseases Primers*, v.4, p.17-107, 2018.

WILLCOCKS, R.J; ROONEY, W.D; TRIPLETT, W.T; FORBES, S.C; LOTT, D.J; SENESAC, C.R; DANIELS, M.J; WANG, D.J; HARRINGTON, A.T;

TENNEKON, G.I; RUSSMAN, B.S; FINANGER, E.L; BYRNE, B.J; FINKEL, R.S; WALTER, G.A; SWEENEY, H.L; VANDENBORNE, K. Multicenter prospective longitudinal study of magnetic resonance biomarkers in a large duchenne muscular dystrophy cohort. *Annal Neurology*, v.4, p.535-47, 2016.

WILLCOCKS, S. J; DENMAN, C.C; ATKINS, H.S. & WREN, B.W. Intracellular replication of the well-armed pathogen *Burkholderia pseudomallei*. *Current Opinng Microbiology*, v.29, p.94–103, 2016.

WILLCOCKS, S.J; DENMAN, C.C; ATKINS, H.S; WREN, B.W. Intracellular replication of the well-armed pathogen *Burkholderia pseudomallei*. *Current Opinion in Microbiology*, v.29, p.94-103, 2016.

WUTHIEKANUN, V; AMORNCHAI, P; SAIPROM, N; CHANTRATITA, N; CHIERAKUL, W; KOH, GCKW; CHAOWAGUL, W; DAY, N.P.J; LIMMATHUROTSAKUL, D; PEACOCK, S.J. Survey of antimicrobial resistance in clinical *Burkholderia pseudomallei* isolates over two decades in Northeast Thailand. *Antimicrobial Agents and Chemotharapy*, v. 55, n. 11, p. 5388-5391, 2011.

WUTHIEKANUN, V; LIMMATHUROTSAKUL, D; CHANTRATITA, N; FEIL, E.J; DAY, N.P; PEACOCK, S.J. *Burkholderia Pseudomallei* is genetically diverse in agricultural land in Northeast Thailand. *PLoS Negleted Tropical Diseases*, v.8, p.e496 2009.

YABUUCHI, E; KOSAKO, Y; OYAIZU, H; YANO, I; HOTTA, H; HASHIMOTO, Y; EZAKI, T; ARAKAWA, M. Proposal of *Burkholderia* gen. nov. and transfer of seven species of the genus *Pseudomonas* homology group II to the new genus, with the type species *Burkholderia cepacia*. *Microbiology and Immunology*, v.12, p.1251-75, 1992.

YIP, T.W; HEWAGAMA, S; MAYO, M; PRICE, E.P; SAROVICH, D.S; BASTIAN, I; BAIRD, R.W; SPRATT, B.G; CURRIE, B.J. Endemic melioidosis in residents of desert region after atypically intense rainfall in central Australia. *Emerging Infection Diseases*, v.6, p-1038-40, 2011.

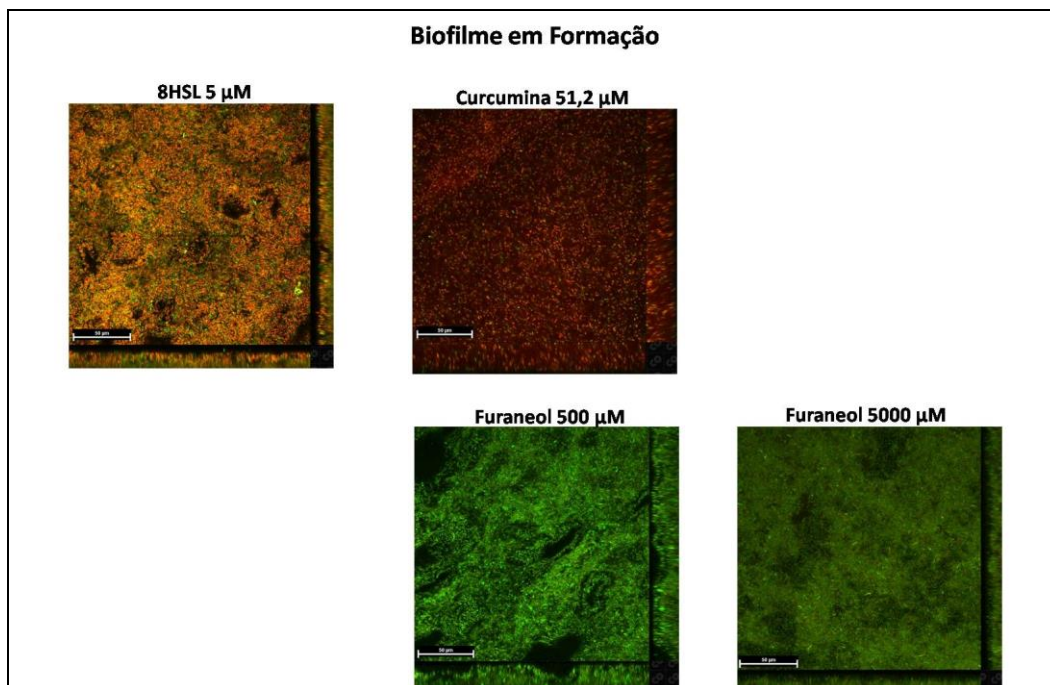
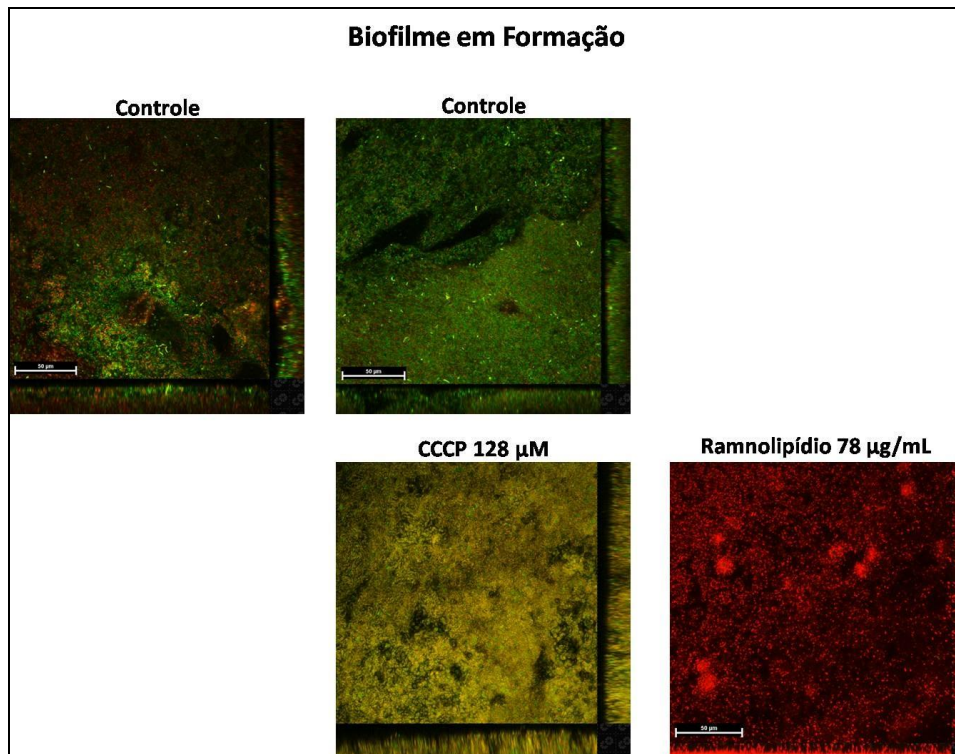
YONG, Y.C; ZHONG, J.J. Impacts of quorum sensing on microbial metabolism and human health. *Advances in Biochemestre Engeenerind/Biotechnology*, v.131, p.25-61, 2013.

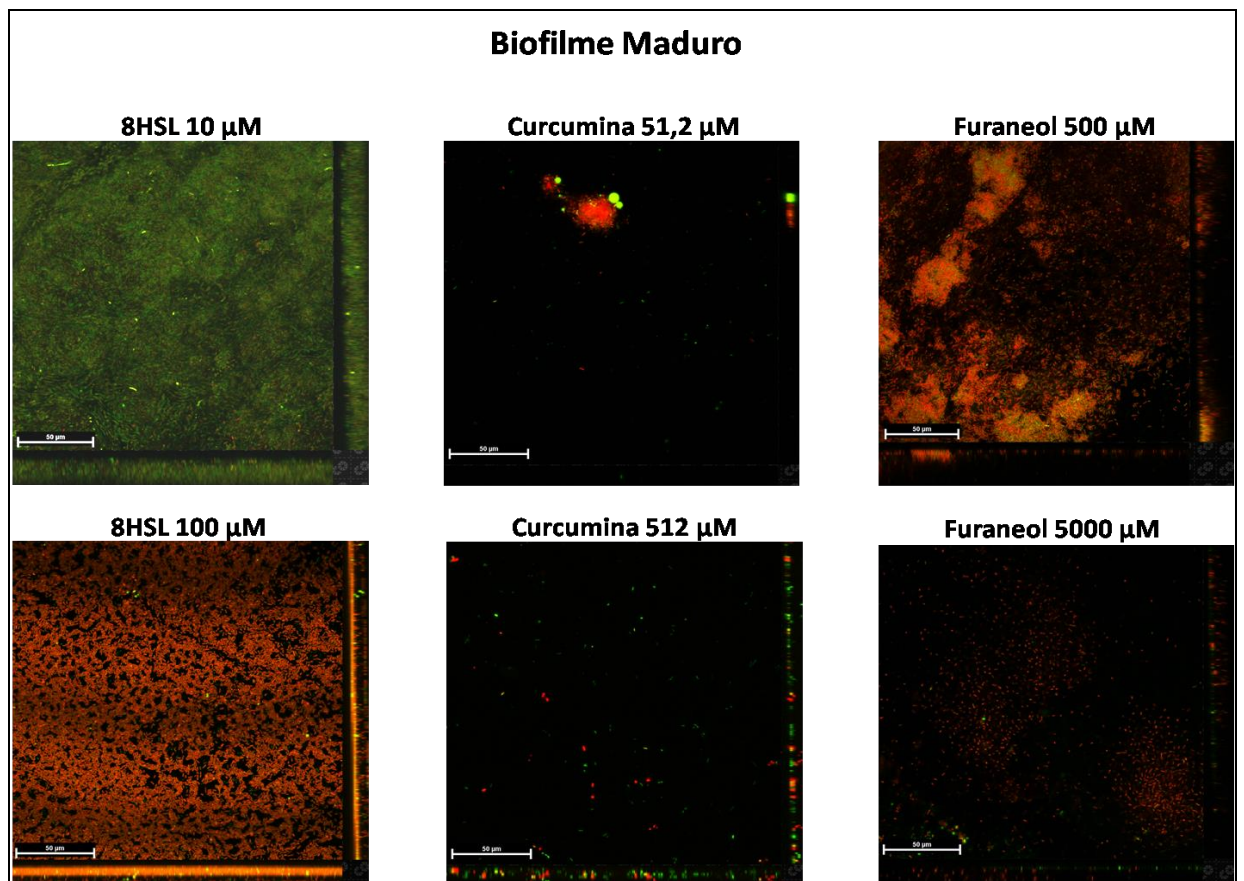
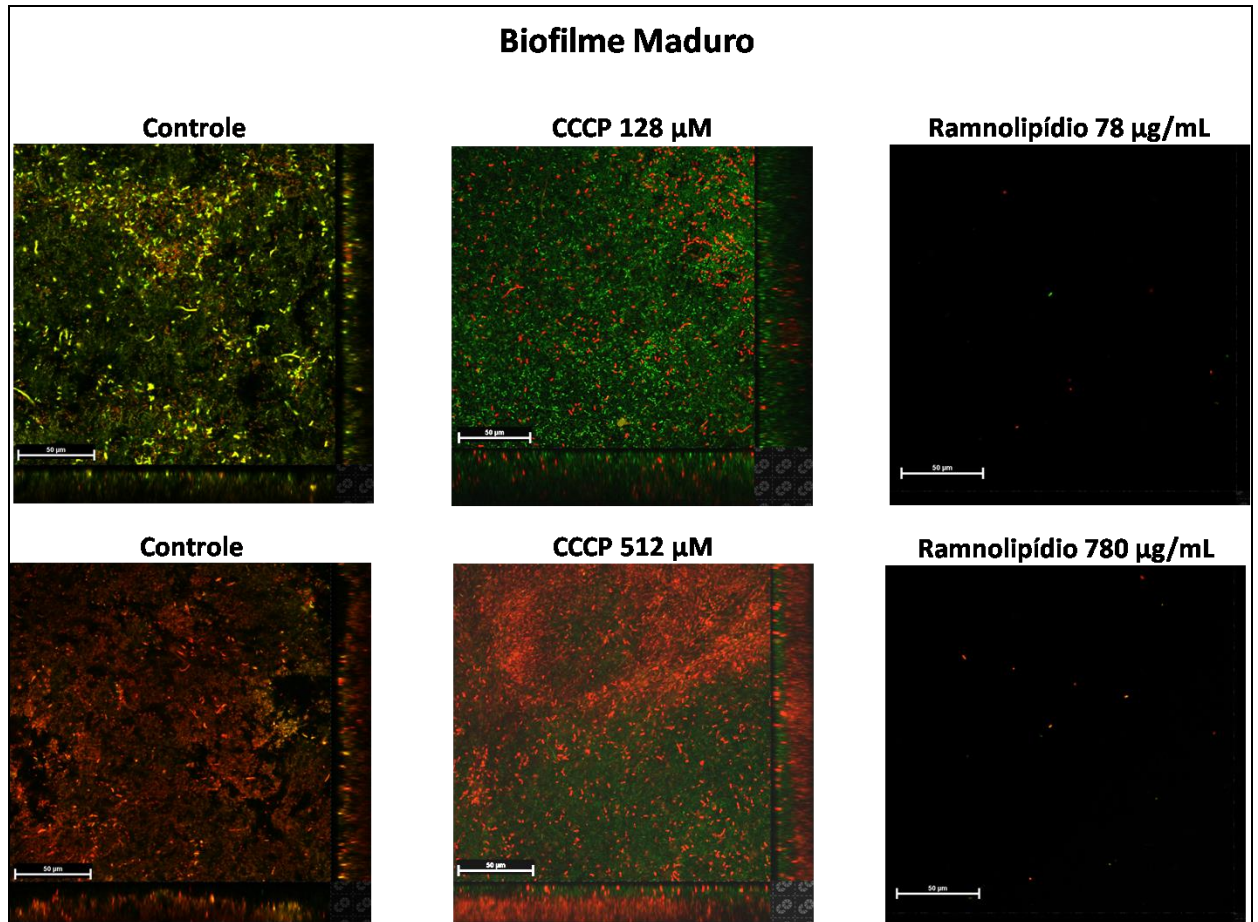
ZEHNDER, A.M; HAWKINS, M.G; KOSKI, M.A; LIFLAND, B; BYRNE, B.A; SWANSON, A.A; ROOD, M.P; GEE, J.E; ELROD, M.G; BEESLEY, C.A; BLANEY, D.D; VENTURA, J; HOFFMASTER, A.R; BEELER, E.S. *Burkholderia pseudomallei* isolates in 2 pet iguanas, California, USA. *Emerging Infectious Diseases*, v.2, p.304-6, 2014.

ZHAN, Y; WU, Y; LI, Q; YU, A. Neuromelioidosis: a series of seven cases in Hainan province, China. *Journal Intitute of Medicine Reserve*, v.2, p.856-867, 2017.

ZONG, Z; WANG, X; DENG, Y; ZHOU, T. Misidentification of *Burkholderia pseudomallei* as *Burkholderia cepacia* by the VITEK2 system. *Journal of Medicine Microbiology*, v.10, p.1483-4, 2012.

11. ANEXO A: IMAGENS DA MICROSCÓPIA CONFOCAL





ANEXO B- PUBLICAÇÕES CIENTÍFICAS ORIGINADOS DO TRABALHO

Preliminary Communication

For reprint orders, please contact: reprints@futuremedicine.com

Rhamnolipid enhances *Burkholderia pseudomallei* biofilm susceptibility, disassembly and production of virulence factors

José JC Sidrim^{†,1}, Crister J Ocadaque^{†,2}, Bruno R Amando², Gláucia M de M Guedes¹, Cecília L Costa², Raimunda SN Brilhante¹, Rossana de A Cordeiro^{*,1,2}, Marcos FG Rocha^{1,3} & Débora SCM Castelo-Branco^{*,1,2}

¹Department of Pathology & Legal Medicine, Postgraduate Program in Medical Microbiology, Laboratory of Emerging and Reemerging Pathogens, Federal University of Ceara, Rua Coronel Nunes de Melo, 1315 – Rodolfo Teófilo – CEP 60430-275, Fortaleza, Ceará, Brazil

²Department of Pathology & Legal Medicine, Postgraduate Program in Medical Microbiology, Group of Applied Medical Microbiology, Federal University of Ceara, Rua Coronel Nunes de Melo, 1315 – Rodolfo Teófilo – CEP 60430-275, Fortaleza, Ceará, Brazil

³School of Veterinary Medicine, Postgraduate Program in Veterinary Sciences, State University of Ceará, Av. Dr. Silas Munguba 1700 – Itaperi – CEP:60714-903, Fortaleza, Ceará, Brazil.

*Author for correspondence: Tel.: +55 853 366 8594; rossanacordeiro@ufc.br

**Author for correspondence: Tel.: +55 853 366 8638; deb_castelobranco@yahoo.com

[†]Both authors contributed equally for this work



Asian Pacific Journal of Tropical Medicine

journal homepage: <http://ees.elsevier.com/apjtm>Original research <https://doi.org/10.1016/j.apjtm.2017.09.004>

Clinical and environmental isolates of *Burkholderia pseudomallei* from Brazil: Genotyping and detection of virulence gene

Tereza de Jesus Pinheiro Gomes Bandeira^{1,2}, Débora de Souza Collares Maia Castelo-Branco¹, Marcos Fábio Gadelha Rocha^{1,3}, Rossana de Aguiar Cordeiro¹, Crister José Ocadaque¹, Manoel de Araújo Neto Paiva^{1,4}, Raimunda Sâmia Nogueira Brilhante^{1,4}, José Júlio Costa Sidrim¹

¹Specialized Medical Mycology Center, Postgraduate Program in Medical Microbiology, Federal University of Ceará, Fortaleza, Ceará, Brazil

²Christus School of Medicine, Fortaleza, Ceará, Brazil

³Postgraduate Program in Veterinary Sciences, State University of Ceará, Fortaleza, Ceará, Brazil

⁴Federal Institute of Education, Science and Technology of Ceará, Acaraú, Ceará, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 25 Jul 2017

Received in revised form 13 Aug 2017

2017

Accepted 11 Sep 2017

Available online 18 Sep 2017

Keywords:

Burkholderia pseudomallei

Meloidosis

RAPD

TTSS gene

ABSTRACT

Objective: To evaluate the genetic diversity of clinical and environmental isolates of *Burkholderia pseudomallei* (*B. pseudomallei*) recovered in Ceará, Brazil, and screen these isolates for the presence of type three secretion system virulence gene.

Methods: Nineteen *B. pseudomallei* isolates (9 from clinical cases and 10 from soils) were analyzed. Random amplified polymorphic DNA was performed with primers OPQ-2, OPQ-4 and OPQ-16 to evaluate the genetic diversity, and type three secretion system gene was detected through polymerase chain reaction.

Results: Random amplified polymorphic DNA showed a genetic relatedness of approximately 50% among the tested *B. pseudomallei* isolates, which were grouped into two clades, of which the biggest ones comprised 18/19 isolates for primer OPQ-2, and 17/19 isolates for primer OPQ-16. Primer OPQ-4 grouped the isolates into three clades comprising 1/19, 3/19 and 15/19 isolates. Additionally, type three secretion system gene was detected in all tested isolates.

Conclusions: This is an effort to type *B. pseudomallei* strains from Ceará, which is important for better understanding this pathogen, contributing for the epidemiological surveillance of meloidosis in this endemic region.

THE EFFLUX PUMP INHIBITOR CARBONIL CIANETO M-CLOROFENIL-HIDRAZONA INTERFER WITH THE DYNAMICS OF BIOFILM FORMATION AND PRODUCTION OF VIRULENCE FACTORS OF *BURKHOLDERIA PSEUDOMALLE*

José Júlio Costa Sidrim^{1§}, Crister José Ocadaque^{2§}, Bruno Rocha Amando², Glaucia Morgana de Melo Guedes¹, Raimunda Sâmia Nogueira Brilhante¹, Rossana de Aguiar Cordeiro^{1*}, Marcos Fábio Gadelha Rocha^{1,3}, Débora de Souza Collares Maia Castelo-Branco^{1,2}

§Both authors contributed equally for this work.

¹ Department of Pathology and Legal Medicine, Postgraduate Program in Medical Microbiology, Specialized Medical Mycology Center, Federal University of Ceará, Fortaleza, Ceará, Brazil;

² Department of Pathology and Legal Medicine, Postgraduate Program in Medical Microbiology, Group of Applied Medical Microbiology, Federal University of Ceará, Fortaleza, Ceará, Brazil;

³ School of Veterinary Medicine, Postgraduate Program in Veterinary Sciences, State University of Ceará, Fortaleza, Ceará, Brazil.

***Corresponding author:**

Rossana de Aguiar Cordeiro. Rua Coronel Nunes Melo, 1315. Rodolfo Teófilo.

CEP: 60420-270. Fortaleza, CE, Brazil. Tel: +55853366-8594. E-mail: rossanacordeiro@ufc.br.