



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE BIOTECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

**Qualificação da atividade inibitória da cafeína sobre motilidade e
formação de biofilme em *Pseudomonas aeruginosa***

CLÓVIS QUEIROZ GOUVEIA

JOÃO PESSOA
2022

CLÓVIS QUEIROZ GOUVEIA

**Qualificação da atividade inibitória da cafeína sobre motilidade e
formação de biofilme em *Pseudomonas aeruginosa***

Dissertação de Mestrado a ser apresentado ao
colegiado do Programa de Pós-Graduação em
Biotecnologia da UFPB para obtenção do grau de
Mestre.

Orientador: Ulrich Vasconcelos da Rocha Gomes

**JOÃO PESSOA
2022**

Catálogo na publicação
Seção de Catalogação e Classificação

G719q Gouveia, Clovis Queiroz.

Qualificação da atividade inibitória da cafeína sobre motilidade e formação de biofilme em *Pseudomonas aeruginosa* / Clovis Queiroz Gouveia. - João Pessoa, 2022.

45 f. : il.

Orientação: Ulrich Vasconcelos da Rocha Gomes.
Dissertação (Mestrado) - UFPB/CBiotec.

1. Biotecnologia - Cafeína. 2. *Pseudomonas aeruginosa*. 3. Fator de virulência. 4. Bioativos botânicos. I. Gomes, Ulrich Vasconcelos da Rocha. II. Título.

UFPB/BC

CDU 60:547.857.4(043)

CLÓVIS QUEIROZ GOUVEIA

**QUALIFICAÇÃO DA ATIVIDADE INIBITÓRIA DA CAFEÍNA SOBRE
MOTILIDADE E FORMAÇÃO DE BIOFILME EM *Pseudomonas aeruginosa***

Dissertação de Mestrado aprovada em 23 de setembro de 2022

BANCA EXAMINADORA

Prof^o. Dr^o. Ulrich Vasconcelos da Rocha Gomes (DB/UFPB)

Orientador/ Presidente

Prof^a. Dr^a. Sildivane Valcácia Silva (DB/UFPB)

Examinadora Interna

Prof^o. Dr^o. Rafael de Almeida Travassos (DBCM/UFPB)

Examinador Externo

Emitido em 23/09/2022

FOLHA Nº 1/2022 - CBIOTEC - LAMA (11.01.44.07)
(Nº do Documento: 1)

(Nº do Protocolo: NÃO PROTOCOLADO)

(Assinado digitalmente em 19/10/2022 11:56)
RAFAEL DE ALMEIDA TRAVASSOS
PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR
1956521

(Assinado digitalmente em 19/10/2022 11:55)
ULRICH VASCONCELOS DA ROCHA GOMES
PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR
2009494

(Assinado digitalmente em 19/10/2022 12:01)
SILDIVANE VALCACIA SILVA
PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR
1652922

Para verificar a autenticidade deste documento entre em <https://sipac.ufpb.br/documentos/> informando seu número: **1**, ano: **2022**, documento (espécie): **FOLHA**, data de emissão: **19/10/2022** e o código de verificação: **18ded251f5**

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por ter permitido que tivesse a oportunidade de ingressar no mestrado e ter tido o estudo como atividade principal.

Aos meus pais Clóvis Gouveia e Genilza Queiroz pelo apoio durante a caminhada do mestrado.

Ao professor Ulrich Vasconcelos por ter aceito ser meu orientador e pelos ensinamentos nessa caminhada.

Aos professores das disciplinas ministradas durante o mestrado pelos ensinamentos.

A FAPESQ pelo fornecimento da bolsa durante o período do mestrado.

A banca examinadora por aceitarem o convite e aos comentários que venham a serem feitos para enriquecer o trabalho.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura química da cafeína.

Figura 2 – Microplaca de 96 poços indicando a concentração mínima inibitória (CIM) da cafeína contra *P. aeruginosa* TGC-04 e ATCC 9027.

Figura 3 – Microplaca de 96 poços indicando a concentração bactericida mínima (CBM) da cafeína contra *P. aeruginosa* TGC-04 e ATCC 9027.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Densidade óptica (590 nm) e percentual de inibição da adesão em superfície plástica de *P. aeruginosa* exposta à 1024 µL/mL de cafeína.

Tabela 2 – Densidade óptica (590 nm) e percentual de inibição da adesão em superfície de vidro de *P. aeruginosa* exposta à 1024 µL/mL de cafeína.

Tabela 3 – Distância percorrida (cm) por *Pseudomonas aeruginosa* TGC-04 e ATCC 9027 expostas à 2064 µg/mL de cafeína no teste *swimming*.

Tabela 4 – Distância percorrida (cm) por *Pseudomonas aeruginosa* TGC-04 e ATCC 9027 expostas à 2064 µg/mL de cafeína no teste *swarming*.

Tabela 5 – Distância percorrida (cm) por *Pseudomonas aeruginosa* TGC-04 e ATCC 9027 expostas à 2064 µg/mL de cafeína no teste *twitching*.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATCC – American Type Culture Collection

BHI – Brain Heart Infusion

CBM – Concentração Bactericida Mínima

CIM – Concentração Inibitória Mínima

EPS – Matriz exopolissacarídica

MEP – Matriz extracelular polimérica

OMS - Organização Mundial da Saúde

Pel – Exopolissacarídeo catiônico

Psl – Pentasacarídeos

QS - *quorum sensing*

GOUVEIA, Clóvis Queiroz. Qualificação da atividade inibitória da cafeína sobre motilidade e formação de biofilme em *Pseudomonas aeruginosa*. João Pessoa, 2022. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Federal da Paraíba, 2022.

RESUMO

Pseudomonas aeruginosa é considerada uma bactéria oportunista, resistente a diversas drogas, apresentando algumas características como: formato em bacilos Gram-negativos, aeróbios, não fermentadores e a OMS (Organização Mundial da Saúde) considera como um patógeno de grau crítico 1 em uma lista de 12 bactérias prioritárias. Possui a capacidade de formar biofilmes, considerados aglomerados de microrganismos, encontrados em monocamadas ou multicamadas, possibilitando a formação de uma matriz extracelular polimérica (MEP). A cafeína é uma substância presente no café e em outras plantas, possuindo atividade antimicrobiana contra bactérias Gram-negativas e Gram-positivas. O presente estudo teve como objetivo avaliar o efeito da cafeína sobre alguns fatores de virulência em dois espécimes de *P. aeruginosa*, isolado TGC04 e linhagem ATCC 9027 (células na forma planctônicas, formação do biofilme em duas superfícies, e na motilidade (*swimming*, *swarming* e *twitching*)). A cafeína a uma concentração de 1024 µL/mL inibiu a formação do biofilme em grau moderado (entre 46,9% e 65%) em superfície plástica, enquanto na superfície vítrea, a inibição foi considerada fraca (26,8%), sem atividade para o isolado TGC04. Os ensaios de motilidade utilizaram uma concentração 2064 µL/mL de cafeína que mostrou inibição maior que 1cm no *swarming* e no *twitching*, e sem atividade no *swimming*, comparadas ao controle.

Palavra-chave: *Pseudomonas aeruginosa*, fator de virulência, bioativos botânicos.

GOUVEIA, Clovis Queiroz. Qualification of the inhibitory activity of caffeine on motility and biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa*. João Pessoa, 2022. Dissertation (Master's in biotechnology) – Universidade Federal da Paraíba, 2022.

ABSTRACT

Pseudomonas aeruginosa is considered an opportunistic microbe, resistant to several drugs, and presenting some characteristics such as: Gram-negative, non-fermenting, aerobic rod, and WHO (World Health Organization) classified it as a critical pathogen listed among 12 priority bacteria. *P. aeruginosa* can form biofilms, i.e., agglomerates of microorganisms, found in monolayers or multilayers, enabling the formation of a polymeric extracellular matrix (MEP). Caffeine is a substance extracted from coffee and other plants and exhibits antimicrobial activity against Gram-negative and Gram-positive bacteria. The present study aimed to evaluate the effect of caffeine on some virulence factors in two specimens of *P. aeruginosa*, isolate TGC04 and strain ATCC 9027 (cells in planktonic form, biofilm formation on two surfaces, and on motility (swimming, swarming, and twitching). Caffeine at 1024 $\mu\text{L}/\text{mL}$ moderately inhibited biofilm formation on plastic surfaces (between 46.9% and 65%), while on the vitreous surface, there was a weakly inhibition (26.8 %), with no activity to isolate TGC04. Motility assays used caffeine at 2064 $\mu\text{L}/\text{mL}$ which exhibited inhibition greater than 1 cm in swarming and twitching, with no activity in swimming, compared to the control test.

Key-words: *Pseudomonas aeruginosa*, virulence factor, botanical bioactives.

SUMÁRIO

1. Introdução.....	9
2. Revisão de Literatura.....	11
2.1 Pseudomonas aeruginosa.....	11
2.2 Biofilme.....	12
2.3 Cafeína.....	13
3. Objetivos.....	15
3.1 Objetivos Geral.....	15
3.2 Objetivos específicos.....	15
4. Material e Métodos.....	16
5. Resultados.....	19
6. Discussão.....	24
7. Conclusão.....	29
Referências.....	30

1 INTRODUÇÃO

Pseudomonas aeruginosa é uma bactéria pertencente à família Pseudomonadaceae em formato de bacilo, classificada como Gram-negativa aeróbia, não fermentadora, considerada oportunista e resistentes a diversas drogas (MOGHADDAM *et al.*, 2014). A *P. aeruginosa* é considerada uma bactéria versátil metabolicamente que pode causar uma grande quantidade de infecções oportunistas graves em pacientes hospitalizados (GELLATLY; HANCOCK, 2013). Segundo a OMS (Organização Mundial da Saúde), a bactéria é classificada como patógeno de grau crítico 1, de uma lista que reúne 12 bactérias prioritárias (SOMMER *et al.*, 2019). *P. aeruginosa* usa sistema de sinalização celular dependente da densidade da população, denominado por *quorum sensing* (QS) para poder sincronizar a expressão de certos genes, adquirindo comportamento de grupo (WHITELEY *et al.* 2001). Este sistema está relacionado com a expressão de diferentes fatores de virulência da bactéria, tais como produção de piocianina (SUDHAKAR *et al.*, 2013), motilidade (CONRAD *et al.*, 2011) e formação de biofilme (WHITELEY *et al.*, 2001).

O biofilme é considerado um aglomerado de microrganismos, formando uma estrutura complexa de organização, envolvida por uma matriz extracelular polimérica (MEP), aderida à uma superfície orgânica ou inorgânica (HURLOW *et al.*, 2015). Os microrganismos apresentam diferentes fenótipos, facilitando a sua diferenciação da forma planctônica em relação à fisiologia e ao metabolismo (WHITELEY *et al.*, 2001). Geralmente, o biofilme atinge um tamanho de 10 a 30 μm (SLEYTR, 1997). Diferentes substâncias estão presentes em sua composição, tais como: proteínas, polissacarídeos, moléculas de DNA e RNA, íons e água (JAMAL *et al.*, 2018). Os biofilmes podem apresentar duas formas, monocamada ou multicamada, dependendo da superfície que está ocorrendo a adesão (KARATAN; WATNICK, 2009).

O modelo da formação de biofilmes é baseado no comportamento exibido por *P. aeruginosa*. Didaticamente a formação do biofilme apresenta quatro etapas: adesão, colonização, maturação e dispersão do biofilme (GUPTA *et al.*, 2016). O primeiro estágio é caracterizado pela aderência das células planctônicas à superfície e a concentração de nutrientes definirá se esta adesão é do tipo reversível ou irreversível (MOORMEIER; BAYLES, 2017; KHIDER *et al.*, 2019). O segundo estágio é caracterizado pela formação das microcolônias por intermédio de moléculas químicas envolvendo QS, ocorrendo a

ativação do mecanismo genético de produção da MEP (ALAV; SUTTON; RAHMAN, 2018). O terceiro estágio é caracterizado pela formação de uma estrutura tridimensional relacionada ao biofilme e pela presença de polímeros, ocorrendo a maturação da estrutura, provocando a expressão de moléculas autoindutoras e tendo participação significativa dos sistemas de QS (CADAVID; ECHEVERRI, 2019). A dispersão celular do biofilme é caracterizada pelo retorno ao estado planctônico das células e por seu deslocamento. Isto ocorre em função de certos fatores, por exemplo, estresse mecânico, falta de nutrientes e aumento populacional (KAMARUZZAMAN *et al.*, 2018). Contudo, a dispersão não é um estágio meramente passivo e os sistemas de QS também participam ativamente no reconhecimento do ambiente e definição do momento da dispersão ser iniciada (TOLKER-NIELSEN, 2014).

Algumas substâncias podem apresentar propriedades antibiofilme, porém os compostos naturais mostram vantagem pela natureza biodegradável, reduzindo os impactos ambientais (GAUR *et al.*, 2019). A cafeína (1,3,7-trimetilxantina) é um exemplo desta classe. A molécula é um alcaloide purínico natural, sendo encontrado em variadas quantidades em *Coffea* spp. (HECKMAN, 2010). A cafeína apresenta atividade antimicrobiana contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, na forma planctônica, incluindo *E. coli*, *P. fluorescens* e *P. aeruginosa* (CHAKRABORTY *et al.*, 2019; RAMANAVICIENE *et al.*, 2003).

Neste contexto, a hipótese do presente documento trata da verificação da atividade da cafeína como agente inibidor de dois importantes fatores de virulência de *P. aeruginosa* das linhagens TGC – 04 e ATCC 9027, formação de biofilme e motilidade.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 *Pseudomonas aeruginosa*

A bactéria *P. aeruginosa* é um organismo Gram-negativo que se apresenta em forma de bacilo bastante difundido no ambiente, podendo ser isolada de diferentes locais como água, solo, plantas e animais, além de possuir uma elevada capacidade de adaptação (SPENCER *et al.*, 2003). É uma espécie não fermentadora, apresentando crescimento em temperaturas entre 5 e 42° C, possui a capacidade de oxidar glicose e de promover a metabolização da acetamida (PALLERONI, 2015). Além disso, produz pigmentos hidrossolúveis: piocianina (azul), pioverdina (verde amarelado fluorescente), piorrubina (vermelho) e piomelanina (marrom) (NEVES *et al.*, 2021).

A bactéria possui um genoma grande medindo aproximadamente 6-7 Mb. Isto possibilita diferentes mecanismos associados à sua persistência e versatilidade metabólica, bem como resistência a antibióticos (BREIDENSTEIN *et al.*, 2011; SOMMER *et al.*, 2020). Neste contexto, *P. aeruginosa* foi listada como um dos 12 patógenos bacterianos prioritários pela Organização Mundial da saúde (WHO, 2017). Em complemento, *P. aeruginosa* é capaz de colonizar em biofilmes. Estas estruturas estão relacionadas com sua virulência e está presente em diversas doenças como endocardite, infecção do trato respiratório e urinário, sepse entre outras. Neste contexto, diversas moléculas naturais e sintéticas são exploradas com a finalidade de inibir a formação do biofilme produzido pela *P. aeruginosa* (DAVIES, 2002; CHAKRABORTY *et al.*, 2020).

Alguns outros fatores de virulência da bactéria são identificados pela expressão de elastase, ramnolipídeos, piocianina e proteases, que entre outros efeitos, podem bloquear a resposta imunológica ou inibir células de defesa do hospedeiro (JIMENEZ *et al.*, 2012; NEVES *et al.*, 2021). Os fatores de virulência de *P. aeruginosa* são mediados pelos sistemas QS. A bactéria apresenta três sistemas denominados: *las*, *rhl* e *pqs* (KARIMINIK; BASERI-SALEHI; KHEIRKHAH, 2017). Os sistemas QS são regulados pela síntese de autoindutores, moléculas de baixa massa molecular, liberadas no meio extracelular e percebida pelas células por meio da ligação em receptores transmembranares. Quanto mais autoindutores são presentes, indica maior população bacteriana (HAWVER; JUNG; NG, 2016). Em *P. aeruginosa*, estas moléculas são especialmente da classe das acil-homoserina lactona (AHL), para os sistemas *las* e *rhl*,

enquanto no sistema *pqs*, duas outras moléculas, 2-heptil-3-hidroxi-4-quinolona (PQS) e sua precursora a molécula 2-heptil-4-quinolona (HHQ) (NEVES, 2021).

Ressalta-se ainda que *P. aeruginosa* apresenta naturalmente uma resistência a agentes antimicrobianos, contudo esta resistência pode ser adquirida, em função da capacidade metabólica flexível e do genoma em codificar uma série de genes de resistência (MULCAHY *et al.*, 2014; CAIXETA *et al.*, 2019). Três mecanismos estão envolvidos na resistência desses patógenos aos antibióticos que são denominados de resistência intrínseca, adquirida e adaptativa (PANG, 2019).

2.2 Biofilme

O biofilme é considerado um conglomerado de células bacterianas possibilitando a adesão de umas às outras, bem como em superfícies bióticas e abióticas (GUPTA *et al.*, 2016; CHAKRABORTY *et al.*, 2020). As células que aderem ao biofilme apresentam-se sob uma camada viscosa protetora de substância polimérica extracelular auto secretada ou MPE (CHAKRABORTY *et al.*, 2020) que se apresenta de formas diferentes de pilares ou cogumelo (KUMAR *et al.* 2019).

O MPE é composto por polissacarídeos, lipídeos, proteínas, ácidos nucleicos e biosurfactantes, cuja função é auxiliar na aderência das células e na estruturação do biofilme, visto que a parede celular hidrofílica se adere melhor à superfícies hidrofílicas e o mesmo acontece nas superfícies hidrofóbicas para as paredes celulares hidrofóbicas (FLEMMING; WINGENDER, 2010; NEVES *et al.*, 2021).

As principais MPE sintetizados por *P. aeruginosa* são Pel (Exopolissacarídeo catiônico), Psl (Pentassacarídeos) e alginato (RYDER; BYRD; WOZNIAK, 2007). As MPE apresentam funções distintas no desenvolvimento do biofilme e na manutenção da bactéria (MANN; WOZNIAK, 2012). O alginato é a maior forma de proteção das células aos estresses ambientais ou químicos (TAN *et al.* 2018). O Psl é considerado importante na adesão inicial das células sésseis em superfícies bióticas ou abióticas (BYRD *et al.*, 2009.; NEVES *et al.*, 2021), enquanto Pel tem a função de proteger o biofilme e aumentar a resistência contra agentes antimicrobianos (COLVIN *et al.*, 2012; NEVES *et al.*, 2021).

Além de abrigo contra vários estressores ambientais, tais como pH, radiação ultravioleta, choque osmótico e desidratação, o EPS possibilita concentrar nutrientes em

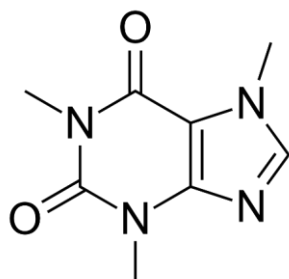
relação ao meio, bem como pode conferir a manutenção da homeostase. Geralmente nos biofilmes afetados por antibióticos ou pelo sistema imunológico humano, o EPS evita a difusão desses compostos, funcionando como trocadores aniônicos, bem como podem sequestrar metais e toxinas (KUMAR, *et al.*, 2019).

2.3 Cafeína

O café compõe uma bebida que apresenta sabor e aroma complexos devido a combinação de vários constituintes químicos voláteis e não voláteis, tais como: ácidos, aldeídos, cetonas, açúcares, proteínas, aminoácidos, ácidos graxos, compostos fenólicos e ação de enzimas sobre estes constituintes (SARRAZIN, 2000). Considerando a presença desses constituintes, a composição química do grão de café cru encontra-se vários compostos nitrogenados como por exemplo a cafeína, composto majoritário dos derivados da planta (BELITZ, 2009).

A cafeína (Fig. 1) é uma molécula da classe das metilxantinas. Quimicamente a cafeína é conhecida como 1,3,7-trimetilxantina ($C_8H_{10}N_4O_2$), sendo considerada um alcaloide, com massa molecular de $194,19 \text{ g.mol}^{-1}$ (TOLEDO *et al.*, 2017). A cafeína também está presente em sementes, folhas e frutos de várias espécies de plantas (GEBEYEHU; BIKILA, 2015), por exemplo chá, guaraná, noz de cola, cacau (TURNBULL *et al.*, 2017; AQUINO *et al.*, 2004), e em medicamentos (GRAHAM, 2001) entre outros. A cafeína é utilizada em uma variedade de produtos, por exemplo, energéticos, refrigerantes, chocolates e preparações farmacêuticas, entre outros (DE MARIA; GOMIDE, 2019).

Figura 1 - Estrutura química da cafeína



Fonte: PUBCHEM, (2021)

A cafeína é considerada uma substância cristalina, branca, pH básico, inodora possuindo sabor amargo característico propiciando amargor para a bebida café e quando se encontra isolada, passa a ser um fármaco, sendo utilizado em medicamentos e bebidas energéticas (BURKE, 2008; WIN *et al.*, 2019).

A cafeína apresenta ação contra diferentes tipos de microrganismos, mostrados em estudos contra a bactéria *Streptococcus mutans* (DOTSEY *et al.*, 2017), *Escherichia coli* e *Pseudomonas fluorescens* (RAMANAVIÉNE *et al.*, 2003), espécies de fungos (CHALFOUN *et al.*, 2001), espécies de moscas varejeiras em sua forma larval e no seu desenvolvimento (CALDERAN, 2021; SILVÉRIO, 2008; BERNEGOSI, 2019) e em insetos (NETO *et al.*, 2012).

A utilização da cafeína em diferentes concentrações (2 a 8 mg/mL) é ativa contra várias enterobactérias (ALMEIDA, 2007). Foi verificado por Carneiro *et al.* (2020) grande potencial da solução composta de cafeína e ácido acético frente *Salmonella enteridis*. A cafeína também exibe atividade inibitória para fungos, como por exemplo *Aspergillus ochraceus*, *Aspergillus flavus*, *Fusarium semitectum* e *Penicillium* sp., em relação ao seu crescimento micelial e esporulação e atua também na produção de toxinas (CHALFOUN *et al.*, 2001; FUJII *et al.*, 2004). Em testes realizados utilizando a cafeína em bactérias Gram-negativas como a *Escherichia coli* e *Pseudomonas fluorescens* atuou como um potencial agente antimicrobiano (CHAKRABORTY *et al.*, 2020).

Diante dessa revisão sobre a ação da cafeína em diferentes espécies de microrganismos incluindo as bactérias, sendo o objeto de estudo uma Gram negativa apresentando capacidade de formar biofilme e de possuir motilidade, com isso foram pontuados alguns objetivos para o estudo.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Avaliar o potencial antibiofilme e antimotilidade da cafeína sobre as linhagens de *Pseudomonas aeruginosa* TGC – 04 e ATCC 9027.

3.2 Objetivos Específicos

- Verificar a atividade antimicrobiana da cafeína na forma planctônica da bactéria;
- Determinar o percentual de inibição da adesão de *P. aeruginosa* em diferentes superfícies;
- Identificar a atividade da cafeína sobre a motilidade;
- Determinar o efeito da cafeína sobre biofilmes pré-formados.

4 MATERIAL E MÉTODOS

Este trabalho foi realizado durante a pandemia de covid-19, ainda em curso, e necessitou ajustes do projeto para cumprir os requisitos do Mestrado em Biotecnologia.

4.1 Local do Experimento

O projeto foi realizado no Laboratório de Microbiologia Ambiental (LAMA) do Centro de Biotecnologia da Universidade Federal da Paraíba (UFPB).

4.2 Cafeína

Foi utilizada cafeína anidra (grau de pureza 99,9%) adquirida na cidade de João Pessoa. Foi preparada uma solução-padrão em água destilada esterilizada cuja concentração final foi de 4068 µg/mL.

4.3 Microrganismos

O estudo foi conduzido com as linhagens de *P. aeruginosa*, sendo uma selvagem, TGC-04, isolada de um solo contaminado por hidrocarbonetos do petróleo (cadastro no SisGen nº A6D0C2F); e uma linhagem padrão de *P. aeruginosa* ATCC 9027.

4.4 Determinação da Atividade Antimicrobiana da Cafeína

Foram realizados os testes para determinação das Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM), em triplicata, pela técnica da microdiluição (HADACEK; GREGER, 2000). Todos os poços foram preenchidos com 150 µL de caldo Müeller-Hinton, em concentração dupla. Em seguida, ao primeiro poço foram adicionados 150 µL da solução com a maior concentração de cafeína, prosseguindo aos demais poços por meio de diluições seriadas (1:2). As diluições variaram de 2064 a 8 µg/mL. Por fim, foram adicionados 10 µL da suspensão das bactérias-teste, preparada em solução de NaCl 0,85%, com turbidez padronizada pelo tubo nº 2 da escala de MacFarland. Poços controles foram preenchidos para verificação da esterilidade do meio, bem como a viabilidade das bactérias estudadas.

As microplacas foram incubadas por 24 h à 35-37 °C. A CIM foi definida como a menor concentração de cafeína que inibiu o crescimento microbiano, verificado pela inspeção visual de turbidez, comparado ao controle (PFFALER et al., 1995). Em seguida, gotas da solução de resazurina 1% foram adicionados em todos os poços para determinação da CBM, definida como a menor concentração de cafeína que causou a morte do inóculo, verificado pela manutenção da cor azul. A virada de rosa para incolor em até 2 h de incubação à temperatura ambiente (25 °C) indicou presença de células viáveis. (CANILLAC; MOUREY, 2001).

4.5 Ensaio *in vitro* da Formação do Biofilme

O ensaio foi realizado em triplicata pela técnica do cristal violeta, com adaptações à metodologia descrita por Balasubramanian et al. (2013) e Khare e Arora (2011). Microsistemas foram preparados contendo caldo Müeller-Hinton, solução de cafeína (CIM e sub-CIM) e inóculo na razão 9:1:0,1. O inóculo foi preparado como no item 4.4. Aos microsistemas foram imersos cupons de vidro medindo 1 cm². O teste também foi conduzido em microtubos, simulando a adesão em superfície plástica. A incubação ocorreu por 96 h em temperatura ambiente (aprox. 28 ±X °C).

Após o período de incubação, o cupom foi removido e o sobrenadante dos microtubos, descartado. Ambos os materiais foram vigorosamente lavados com água de torneira, com intuito de remover qualquer crescimento planctônico depositado, reservando-se posteriormente para secagem por 1 h. Em seguida, o cupom de vidro foi imerso em frasco contendo 5 mL de solução de cristal violeta 1%, enquanto o microtubo foi preenchido com 1,5 mL da mesma solução. Após 20 min, o corante foi descartado e o excesso removido com água de torneira. Uma vez seco, as matrizes foram tratadas em igual volume de etanol absoluto e após um repouso por 30 minutos, uma alíquota de 1500 µL da solução de cristal violeta-etanol foi lida a 590 nm, utilizando o espectrofotômetro de marca Quimis do modelo U2M. O controle do teste em ambas as superfícies foi realizado sem a cafeína.

4.6 Percentual de Inibição da Adesão

O percentual de inibição foi calculado pela diferença entre as médias da absorbância, determinada no ensaio *in vitro* da formação do biofilme e do controle,

dividido pela absorvância do controle, multiplicando por 100 este valor. Com isso a adesão pode ser classificada como fraca ($\leq 40\%$), moderada (40-80%) ou forte ($> 80\%$) (RODRIGUES *et al.*, 2010). O valor da leitura da absorvância a um comprimento de onda de 590 nm, do caldo Müeller-Hinton foi utilizado para determinar o ponto de corte, permitindo assim afirmar que três vezes este valor indica a capacidade das células em formar biofilme (PAGANO *et al.*, 2004).

4.7 Ensaio de Motilidade

Os ensaios de motilidade compreenderam os testes realizados em triplicata, denominados por *swimming* (movimento dirigido por flagelos em ambientes aquosos), *swarming* (movimento rápido dirigido por flagelos sobre superfícies sólidas) e *twitching* (movimento dirigido pelo *pilus* em superfícies sólidas), realizados conforme descrito por Rashid e Kornberg (2000).

Células de cultura recente foram inoculadas no agar BHI semissólido (*swimming*), na superfície do agar BHI (*swarming*), e para o fundo do agar BHI (*twitching*). Aos meios foram adicionadas as soluções de cafeína na concentração igual ao CIM.

As placas foram incubadas por 24-48h à temperatura ambiente e a motilidade foi avaliada, medindo o diâmetro da zona de movimentação a partir do ponto de inoculação (cm). O controle do teste foi realizado com meios sem adição de cafeína (ROSSI *et al.*, 2018).

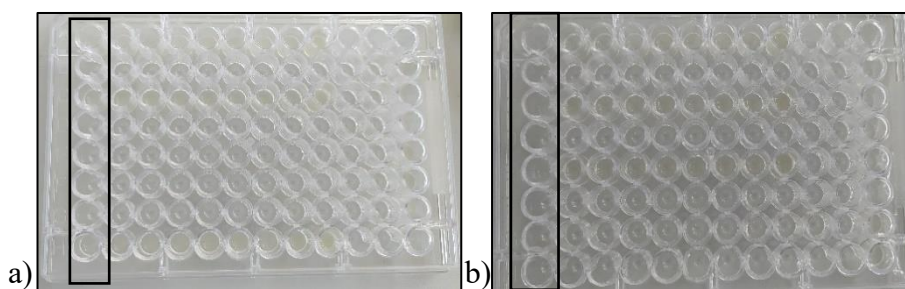
Os testes que nesse trabalho foram realizados em triplicata, sendo apresentados os resultados como a média \pm desvio padrão.

5 RESULTADOS

5.1 Concentração Inibitória Mínima (CIM)

A CIM da cafeína contra ambas as linhagens da *P. aeruginosa* TGC-04 e ATCC 9027 foi de 2064 µg/mL. A Figura 2 mostra as placas de 96 poços indicando a CIM para as duas linhagens da *P. aeruginosa*.

Figura 2 – Concentração Inibitória Mínima (CIM) da cafeína contra *P. aeruginosa* TGC-04 (esquerda) e ATCC 9027 (direita). Na linha inferior da placa observa-se turbidez, indicando crescimento das culturas testadas no poço cuja concentração de cafeína era 2064 µg/mL

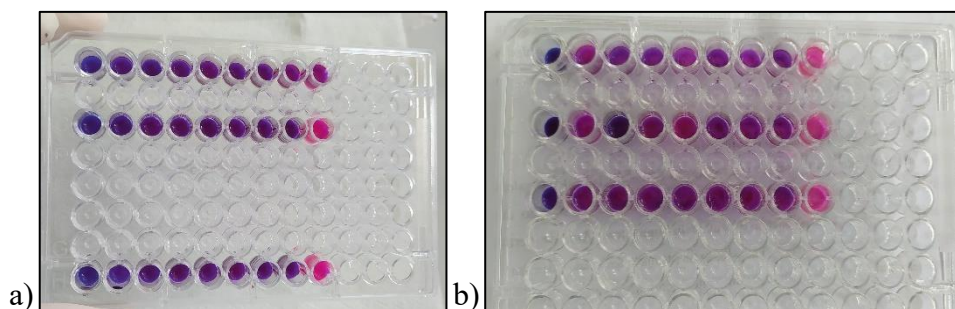


Fonte: Autor

5.2 Concentração Bactericida Mínima (CBM)

A CBM da cafeína foi idêntica à CIM observada anteriormente, isto é, 2064 µg/mL, para ambas as bactérias testadas. A Figura 3 mostra a microplaca de 96 poços utilizada na determinação da CIM contendo resazurina 1% empregada no teste de determinação da CBM.

Figura 3 – Concentração Bactericida Mínima (CBM) da cafeína contra *P. aeruginosa* TGC-04 (esquerda) e ATCC 9027 (direita). A cor azul indica poços com culturas não viáveis



Fonte: Autor

5.3 Ensaio *in vitro* da Formação do Biofilme em Superfície Plástica

Durante o período de incubação o biofilme se formou nas primeiras 24 horas, e nas 24 h subsequentes, a cafeína foi responsável por uma redução importante da adesão do isolado TGC04. Contudo, às 72 h, o conteúdo celular aderido estava aumentado, permanecendo assim até 96 h. Quanto à linhagem *P. aeruginosa* ATCC 9027, a inibição durou até 72 h, quando o percentual da adesão começou a aumentar, representando uma redução média de 65%.

Apenas a concentração subinibitória (1024 µg/mL) da cafeína promoveu efeito sobre a redução da adesão de *P. aeruginosa* TGC04 e ATCC 9027. A adesão foi inibida em $46,9 \pm 0,7$ e $65,0 \pm 1,0\%$, respectivamente, indicando que as bactérias tiveram uma adesão moderada. O valor do ponto de corte foi de 0,533 (densidade óptica do meio a 590 nm = 0,177). Isto indicou que às 72 h, as bactérias testadas apresentavam novamente a capacidade de formar biofilme, indicando um efeito inibitório, temporário da cafeína. A Tabela 1 informa os valores obtidos pela leitura das amostras no espectrofotômetro referentes ao tempo de incubação dos microssistemas e o percentual de redução da formação do biofilme pelas linhagens TGC04 e ATCC 9027.

Tabela 1 – Densidade óptica (590 nm) e percentual de inibição da adesão em superfície plástica de *P. aeruginosa* exposta à 1024 µg/mL de cafeína

Espécime	Tempo de incubação (horas)				%redução
	24	48	72	96	
TGC04	2,165	---	0,721	1,045	
	2,126	0,800	0,731	1,143	
	2,246	0,734	---	1,281	
	Média	2,179±0,061	0,767±0,047	0,726±0,007	
Controle	2,192±0,107	0,984±0,156	0,839±0,025	1,432±0,103	
ATCC 9027					
	2,127	1,622	0,481	0,574	
	2,048	---	0,581	0,363	
	2,054	0,801	0,830	1,245	
	Média	2,076±0,044	1,212±0,581	0,631±0,180	
Controle	2,051±0,072	1,088±0,790	1,355±0,493	0,865±0,182	

5.4 Ensaio de Formação do Biofilme na Superfície do Vidro

Durante o período de incubação do isolado TGC04 foi observada adesão crescente até às 96 h. Em complemento, houve produção de piocianina, verificada pela coloração azul, difundida nos frascos. Por outro lado, a linhagem *P. aeruginosa* ATCC 9027 demonstrou uma redução da adesão em até 48 h, com o posterior reestabelecimento, porém a redução média da adesão celular foi na ordem de 26,8±0,2%, considerada fraca. Neste teste, o ponto de corte foi de 0,864 (densidade óptica do meio a 590 nm = 0,288), indicando que a linhagem *P. aeruginosa* ATCC 9027 foi mais sensível no teste, não demonstrando capacidade de adesão ao vidro a partir de 48 h de exposição à cafeína (Tabela 2).

Tabela 2 – Densidade óptica (590 nm) e percentual de inibição da adesão em superfície de vidro de *P. aeruginosa* exposta à 1024 µg/mL de cafeína

Espécime	Tempo de incubação (horas)				%redução
	24	48	72	96	
TGC04	0,829	0,747	1,725	1,970	
	0,827	0,989	1,903	1,910	
	Média	0,828±0,001	0,868±0,171	1,814±0,126	1,940±0,042
Controle	1,341±0,322	1,067±0,041	1,868±0,031	1,810±0,143	
ATCC 9027					
	1,019	0,773	0,829	0,897	
	1,026	0,672	0,789	0,600	
Média	1,023±0,005	0,723±0,071	0,809±0,028	0,749±0,210	26,8±0,2
Controle	0,574±0,150	0,538±0,021	0,639±0,055	0,701±0,029	

5.5 Ensaios de Motilidade

5.5.1 *Swimming*

Os resultados obtidos nesse ensaio mostraram que a cafeína em sua concentração de 2064 µg/mL não inibiu o seu deslocamento de *P. aeruginosa* ATCC 9027, em comparação com o controle no meio. Por outro lado, *P. aeruginosa* TGC04 sofreu uma redução de 23,52% após 48h de exposição à cafeína (Tabela 3)

Tabela 3 – Distância percorrida (cm) por *Pseudomonas aeruginosa* TGC-04 e ATCC 9027 expostas à 2064 µg/mL de cafeína no teste *swimming*

Testes	Controle (TGC04)	Teste (TGC04)	Controle (ATCC 9027)	Teste (ATCC 9027)
	1,5	2,0	2,0	4,1
	1,7	1,0	2,5	5,6
	1,8	1,0	1,4	5,0
Média	1,7±0,2	1,3±0,6	2,0±0,6	4,9±0,8

5.5.2 *Swarming*

Os resultados obtidos nesse ensaio indicaram que *P. aeruginosa* TGC04 não sofreu inibição da sua movimentação na superfície do meio, em contrapartida a linhagem ATCC 9027 apresentou uma pequena inibição no seu deslocamento de 12,76%, depois de 48 horas de incubação (Tabela 4).

Tabela 4 – Distância percorrida (cm) por *Pseudomonas aeruginosa* TGC-04 e ATCC 9027 expostas à 2064 µg/mL de cafeína no teste *swarming*

Testes	Controle (TGC04)	Teste (TGC04)	Controle (ATCC 9027)	Teste (ATCC 9027)
	1,6	4,0	5,2	2,5
	1,1	5,0	3,4	4,1
	1,2	3,0	5,6	5,8
Média	1,3±0,3	4,0±1,0	4,7±1,2	4,1±1,7

5.5.3 Twitching

Houve redução do movimento para ambas as bactérias testadas, comparadas com o controle. O isolado TGC04 apresentou uma redução de 27,27%, enquanto a linhagem *P. aeruginosa* ATCC 9027 reduziu em 8% depois de 48 horas de incubação (Tabela 5).

Tabela 5 – Distância percorrida (cm) por *Pseudomonas aeruginosa* TGC-04 e ATCC 9027 expostas à 2064 µg/mL de cafeína no teste *twitching*

Testes	Controle (TGC04)	Teste (TGC04)	Controle (ATCC 9027)	Teste (ATCC 9027)
	3,5	3,2	4,4	2,8
	2,2	2,3	4,6	5,8
	4,1	1,7	6,0	5,3
Média	3,3±1,0	2,4±0,8	5,0±0,9	4,6±1,6

6 DISCUSSÃO

6.1 Atividade Sobre Células Planctônicas e Sésseis:

O presente estudo buscou identificar se a cafeína apresenta algum efeito inibitório em dois espécimes de *P. aeruginosa* na forma planctônica e na produção e formação do biofilme sob duas superfícies distintas. Além disso, o estudo avaliou o efeito da cafeína sobre a motilidade desses espécimes por meio de três ensaios.

P. aeruginosa é a bactéria Gram-negativa não fermentadora mais prevalente frequentemente encontrada em ambientes hospitalares (OLIVEIRA; VASCONCELOS; CALAZANS, 2021), afetando pacientes hospitalizados, sendo associadas a vários tipos de infecções (FIGUEREDO *et al.*, 2021). Em complemento, a bactéria possui a capacidade de ser muito versátil em relação aos nutrientes necessários para a sua manutenção no ambiente, como por exemplo, as fontes de carbono e nitrogênio, e com isso pode crescer em superfícies úmidas (HARMSEN *et al.*, 2010). A busca por compostos com efeito antibiofilme pode ser a chave para as novas antibioticoterapias (KAUFFMANN *et al.*, 2017) e nesse sentido, os compostos naturais, biodegradáveis, se destacam por serem ecologicamente corretos e sustentáveis (PEREIRA *et al.*, 2015).

O isolado TGC04 é originado do solo de posto de gasolina, contaminado por combustíveis fósseis (CAVALCANTI *et al.*, 2019), enquanto a linhagem ATCC 9027 foi isolada a partir de uma infecção de ouvido em 1980 nos Estados Unidos, contudo produz baixos níveis de fatores de virulência, sendo bastante utilizada em padronizações de testes (BECERRA *et al.*, 2016). Essas características possibilitam uma comparação do percentual de inibição entre duas linhagens de *P. aeruginosa* que possuem diferentes origens.

As células planctônicas expostas à cafeína apresentaram valores de CIM muito elevados quando comparados com estudos anteriores. Os resultados divergiram do que a literatura descreve a respeito da atividade antimicrobiana da cafeína contra *P. aeruginosa*. Como por exemplo os estudos de Chakraborty, *et al.*, (2020) e Ramanaviciene, *et al.*, (2003) os valores da CIM da cafeína demonstraram ação em bactérias Gram-negativas.

Diferentes compostos obtidos de matérias primas naturais apresentaram ação contra bactérias, em estudos utilizando a linhagem *P. aeruginosa* ATCC 9027 foi possível observar uma maior sensibilidade a extratos das folhas do araçazeiro e butiazeiro,

observando-se as concentrações mínimas inibitórias (CIM) de 1,56 mg/mL e 3,12 mg/mL, respectivamente (ZANDONÁ, 2021). Essa linhagem de *P. aeruginosa* também em estudos com xilitol e isotiazolona, indicando efeito sobre a formação do biofilme inicial (ZHOU *et al.*, 2019). Adicionalmente, a mesma linhagem foi sensível ao peptídeo aureína K combinado com a ciprofloxacina (SILVA, 2017).

De uma forma geral, *P. aeruginosa* é uma espécie cuja sensibilidade foi observada para alguns compostos naturais que foram utilizados isoladamente, tanto na sua forma planctônica, como em sua forma sésil. Alguns desses compostos isolados foram o extrato de própolis (SANTOS *et al.*, 2020), o ácido quínico (LU *et al.*, 2021) e o isoeugenol (SHASTRY *et al.*, 2022).

O mecanismo de ação da cafeína em bactérias Gram-negativas ocorre pela alteração da permeabilidade da membrana, levando à lise celular (KABIR *et al.*, 2014; LOU *et al.*, 2011; DASH; GUMMADI, 2008), porém, a cafeína induz uma inibição dos fatores de virulência na *P. aeruginosa* (CHAKRABORTY *et al.*, 2020). A resistência da *P. aeruginosa* à cafeína pode estar ligada a diferentes mecanismos, por exemplo a expressão de genes que não são encontrados nas formas planctônicas, bem como, inativação através da ação do EPS ou enzimas presentes na matriz do biofilme, redução da atividade metabólica, existência de bombas de efluxo, possibilidade de alteração da composição das proteínas integrantes da membrana citoplasmática, presença de diferentes padrões nesse biofilme e a presença de uma estrutura complexa caracterizando o biofilme (MELANDA, 2019).

P. aeruginosa apresenta algumas características que conferem uma maior resistência a agentes antimicrobianos, tais como a formação de biofilmes (MORADALI *et al.*, 2017; THI *et al.*, 2020), respostas promovidas através de comunicação célula a célula (ROMLING, *et al.*, 2012), fatores de virulências como: adesinas, *pili*, flagelos, e síntese de ramnolipídeos (KARIMINIK *et al.*, 2017). A resistência pode também estar relacionada ao local de origem de um isolado exposto a um ambiente altamente caracterizado por estresses recorrentes, favorecendo troca de genes (LARSSON; FLACH, 2022). Isto levou à escolha dos dois espécimes desse trabalho, representando um isolado selvagem e um clínico.

A inibição de biofilmes de *P. aeruginosa* mediada por compostos naturais já foi observada em estudos prévios. Jadeja *et al.* (2020) observaram que a inibição da

piocianina, pigmento específico de *P. aeruginosa*, promovida pelo ácido gálico e pelo Chá-verde (*Camellia sinensis*) conferiram uma inibição da formação do biofilme, nas concentrações respectivas de 1,7 mg/mL e 1,7 mg/mL. Em complemento, a *P. aeruginosa* ATCC 9027 foi sensível quando exposta a outros bioativos naturais, tais como extratos das folhas do araçazeiro (*Psidium cattlejanum* Sabine) e butiazeiro (*Butia odorata*), exibindo CIM de 1,56 e 3,12 mg/mL respectivamente (ZANDONÁ, 2021). Adicionalmente, a mesma linhagem foi testada com bioativos sintéticos e também se mostrou sensível. Exposta ao xilitol e isotiazolona, o biofilme foi inibido porque a adesão foi impedida (ZHOU *et al.*, 2019), enquanto Shastry *et al.* (2022) detectaram uma inibição de 70% do biofilme, utilizando isoeugenol 400 µM.

O processo de adesão dos microrganismos ocorre naturalmente em meios aquosos e são dependentes de algumas propriedades superficiais como tensão superficial, entalpia superficial por unidade de área, composição da superfície, interfaces das superfícies de adesão (plástico, vidro, polímeros, entre outros), e das membranas dos microrganismos. Algumas propriedades e características do meio podem influenciar em especial temperatura, pH, força iônica e a disponibilidade dos nutrientes (UBBINK, 2007). Em complemento, a adesão de células depende de características referentes a hidrofiliicidade/hidrofobicidade do material e da própria célula. Superfícies celulares hidrofílicas se caracterizam pela razão C:N elevada, enquanto em superfícies hidrofóbicas ocorre a razão C:O elevada. Depende das espécies bacterianas, das fases de desenvolvimento e das características do ambiente a hidrofobicidade é prevalente (DESROUSSEAUX, 2013.; CAMPOCCIA, 2012.; CARVALHO, 2014). Além disso, baixas concentrações de ramnolipídeos aumentam a hidrofobicidade da parede de *P. aeruginosa*, provocando uma liberação de lipopolissacarídeo (LPS) da superfície celular (HARMSSEN, *et al.*, 2010).

As bactérias Gram-negativas são consideradas seres hidrofílicos devido a presença do LPS (lipopolissacarídeos), conseqüentemente a ausência do LPS o torna seres mais hidrofóbicos (PALMER, 2007; ARAÚJO, *et al.*, 2010). A hidrofobicidade das bactérias Gram-negativas é aumentada quando a quantidade de água no meio é reduzida devido a presença de grande concentração de lipídeos e pouco peptideoglicano em sua membrana externa (STREVETT, 2003). A superfície do vidro é considerada uma superfície mais hidrofílica do que o plástico (TEIXEIRA, *et al.*, 2005; ARAÚJO, *et al.*, 2010). Quanto a esta característica da membrana da *P. aeruginosa*, ambos espécimes

empregados neste estudo foram identificados como hidrofóbicos, em estudos prévios, o isolado TGC04 (OLIVEIRA *et al.*, 2021) e a linhagem ATCC 9027 (ZHONG, 2015).

Isto pode explicar o fato de que foi observada uma adesão maior na superfície vítrea, nas condições dos espécimes submetidos à cafeína, do que no controle. Além do vidro ser uma superfície hidrofílica, sob estresse, *P. aeruginosa* lança de seus artifícios fisiológicos e metabólicos para promover a permanência (BUCIOR, 2012). Contudo, ressalta-se que a adesão moderada e fraca são vantagens ecológicas da espécie, aderindo-se dessa forma a espécie garante sucesso na competição com outros microrganismos, bem como pode migrar com maior facilidade após desprender-se do biofilme (NORAT *et al.*, 2022).

Em complemento, os pontos de cortes obtidos nos ensaios de formação do biofilme para as superfícies utilizadas do plástico e a vítrea foram 0,177 e 0,288 respectivamente. De acordo com Peixoto *et al.* (2015), três vezes este valor indica que as células presentes no teste são capazes de aderir e formar biofilmes, podendo justificar também os resultados observados nos ensaios.

6.2 Atividade Sobre a Motilidade

A mobilidade de isolados de *P. aeruginosa*, originada de ambientes diferentes pode ocorrer de formas distintas. O estudo de Souza *et al.* (2019) avaliou a motilidade (*swimming*, *swarming* e *twitching*) em espécimes isolados de ambientes clínico e selvagem. Os autores verificaram que na motilidade do tipo *swimming* houve diferença entre os isolados, no entanto, no tipo *swarming* não apresentou diferença entre os isolados e o tipo *twitching*, a diferença nos resultados foi menos significativa que a vista no teste do *swimming*.

A motilidade do tipo *swimming* ocorre em ambientes de ágar com uma concentração baixa, estando associado à quimiotaxia e também à força hidrodinâmica (KHAN *et al.*, 2019). Sob certas superfícies, *P. aeruginosa* consolida a aderência utilizando movimentos envolvendo o *swarming* e o *twitching*. O tipo *swarming* de motilidade acontece em ambientes viscosos ou semissólidos requerendo a ação do flagelo, *pili* tipo IV, ramnolipídicos, bem como a densidade bacteriana específica e disponibilidade de nutrientes (KHAN *et al.*, 2019). O processo de motilidade *twitching* ocorre baseado na extensão e retração dos *pili* T4P em meios sólidos (PETROV *et al.*,

2013). O processo de *swarming* envolve o início da adesão e o processo de *twitching* ocorre com o biofilme maduro (KHAN *et al.*, 2019). Baseado nisto, pode-se inferir que o comportamento dos dois espécimes neste estudo dependeu mais destes dois eventos, em detrimento ao *swimming*. Ressalta-se que os percentuais de redução foram calculados considerando os valores de 24 e de 96 h de teste, momento que o biofilme já se encontra maduro.

Rossi *et al.* (2018), investigando a capacidade de motilidade em 74 linhagens de *Pseudomonas* spp. isoladas de laticínios, verificaram que os movimentos para frente, bem como os giros não foram maiores que 1 cm, relacionando este achado à temperatura empregada no ensaio, 30°C, bem como ao tipo de flagelo monotríquio polar e dos *pili* multitríquios polares. Em oposição ao observado por estes autores, no presente estudo, os movimentos flagelares dos espécimes testados foram significativamente maiores, em especial o isolado selvagem TGC04, mais adaptado às condições de estresse ambiental, comparada a isolados de alimentos os da linhagem ATCC 9027, anteriormente descrita como menos virulenta que demais isolados padrões.

Segundo Shastry, *et al.* (2022), o isoeugenol a uma concentração de 400 µM promoveu uma redução da expressão da virulência reguladas pelo sistema QS, sugerindo que a inibição ocorreu no sistema *rhl*. A atividade do isoeugenol sobre a motilidade do tipo *swarming* na *P. aeruginosa* foi a inibição dos dendritos. Já os *pili* do tipo IV são considerados apêndices longos e finos (5 a 8 nm de diâmetro), semelhantes à pelos, e encontrados nas superfícies de células procariotas (*Bacteria* e *Archaea*). A sua função é de fixação e adesão em superfícies, provocando a agregação célula-célula, formação do biofilme e motilidade (LEIGHTON *et al.*, 2015). Estudos sugerem que a *P. aeruginosa* induz seu sistema de virulência de forma dependente do gene *PilY* (LUO *et al.*, 2015; SIRYAPORN *et al.*, 2014), durante a fixação superficial tem a atuação do AMPc para controle da expressão do fator de virulência (FULCHER *et al.*, 2010). Em complemento, os *pili* tipo IV são desnecessários na motilidade do tipo *swarming*, podendo interferir negativamente (YANG, 2017), presença dos *pili* tipo IV quanto a motilidade na modalidade *twitching* estão relacionadas à uma maior virulência (BURROWS, 2012).

CONCLUSÃO

Nas condições empregadas neste estudo, a cafeína foi um composto bioativo importante, em termos da atividade antimicrobiana, no entanto fenótipos específicos e particulares de cada isolado ou linhagem, parecem influenciar na resposta ao estresse causado pela molécula. Futuros estudos poderão esclarecer os mecanismos pelos quais estes eventos podem ocorrer, baseando-se na origem da *P. aeruginosa*.

REFERÊNCIAS

- AQUINO, F.W.B.; AMORIM, A.G.N.; PRATA, L.F.; NASCIMENTO, R.F. Determinação de aditivos, aldeídos furânicos, açúcares e cafeína em bebidas por cromatografia líquida de alta eficiência: validação de metodologias. *Ciênc Tecnol Alim.* v. 24, n. 1, p. 32-38, 2004.
- ALAV, I.; SUTTON, J. M.; RAHMAN, K. M. Role of bacterial efflux pumps in Biofilm Formation. *J Antimicrob Chemother.* v. 73, n. 8, p. 2003-2020, 2018.
- ALMEIDA, A. A. P. Atividade antimicrobiana de extratos e compostos fenólicos e nitrogenados do café: avaliação in vitro e em modelo alimentar. 2007. 135 f. Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2007.
- ARAÚJO, E. A.; ANDRADE, N. J.; CARVALHO, A. F.; RAMOS, A. M.; SILVA, C. A. S.; SILVA, L. H. M. Aspectos coloidais da adesão de microrganismos. *Química Nova.* v. 33, p. 1940-1948, 2010.
- BALASUBRAMANIAN, D.; SCHNEPER, L.; KUMARI, H.; MATHEE, K. A dynamic and intricate regulatory network determines *Pseudomonas aeruginosa* virulence. *Nucleic Acids Res.* v. 41, n. 1, p.1-20, 2013.
- BECERRA, M. V. G.; VALDEZ, A. G.; MARTINEZ, M. J. G.; MORALES, E.; GONZÁLEZ, L. S.; MÉNDEZ, J. L.; DELGADO, G.; ESPINOSA, R. M.; SOTO, G. Y. P.; YAÑEZ, M. C.; CHÁVEZ, G. S. *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 is a non-virulent strain suitable for mono-rhamnolipids production. *Appl Microbiol Biotechnol.* v. 100, n. 23, p. 9995–10004, 2016.
- BELITZ, H. D.; GROSCH W.; SCHIEBERLE P.; Coffee, Tea and Cocoa. Food Chemistry. Springer, v. 4, 2009.
- BERNEGOSI, A. C. Efeito tóxico da cafeína sobre o ciclo de vida de *Chironomus sanctiparoli* (Chironomidae, Diptera) e *Daphnia magna* (Daphniidae, Cladocera). Tese (Doutorado). Universidade de São Paulo. 2019.

BREIDENSTEIN E B M.; FUENTE-NÚÑEZ C.; HANCOCK R E W. *Pseudomonas aeruginosa*: All roads lead to resistance. *Trends Microbiol.* v. 19, p. 419–426, 2011.

BYRD, M. S., SADOVSKAYA, I., VINOGRADOV, E., LU, H., SPRINKLE, A. B., RICHARDSON, S. H., MA, L., RALSTON, B., PARSEK, M. R., ANDERSON, E. M., LAM, J. S., WOZNIAK D J. Genetic and biochemical analyses of the *Pseudomonas aeruginosa* Psl exopolysaccharide reveal overlapping roles for polysaccharide synthesis enzymes in Psl and LPS production. *Molec Microbiol.* v. 73, n. 4, p. 622-638, 2009.

BUCIOR, I.; PIELAGE, J. F.; ENGEL, J. N. *Pseudomonas aeruginosa* Pili and Flagella mediated distinct binding and signaling events at the apical and basolateral surface of airway epithelium. *Plos Pathogens.* v. 8, n. 4, p. 1-18, 2012.

BURKE, L. M. Caffeine and sports performance. *Appl. Physiol. Nutr. Metab.* v. 33, n. 6, p.1319-1334, 2008.

BURROWS, L. L. *Pseudomonas aeruginosa* twitching motility: type IV pili in action. *Annu Rev Microbiol.* v. 66, p. 493–520, 2012.

CAIXETA M. A.; BRAGA A S.; ALMEIDA D G S.; PINTO O G.; SANTANA E S.; NAVES P L F. Estudo de formação de biofilmes por *Pseudomonas aeruginosa*. **ENCICLOPÉDIA BIOSFERA**, Centro Científico Conhecer - Goiânia, v. 16, n. 29, p. 1870, 2019.

CADAVID, E.; ECHEVERRI, F. The search for natural inhibitors of biofilm formation and the activity of the autoinductor C6-AHL in *Klebsiella pneumonia* ATCC 13884. *Biomolecules.* v. 9, n. 2, p. 49, 2019.

CALDERAN, F. L. Efeito da cafeína no desenvolvimento de *Chrysomya megacephala* (Diptera: Calliphoridae), mosca-varejeira de importância forense. Dissertação (mestrado). Pós-graduação em Ciências Biológicas. Instituto de Biociencias do campus de Rio claro, Universidade Estadual Paulista. Rio Claro, 2021.

- CANILLAC, N.; MOUREY, A. Antibacterial activity of the essential oil of *Picea excelsa* on *Listeria*, *Staphylococcus aureus* and coliform bacteria. *Food Microbiol.* v. 18, p. 261-268, 2001.
- CAMPOCCIA, D.; CANGINI, I.; SELAN, L.; VERCELLINO, M.; MONTANARO, L.; VISAI, L., ARCIOLA, C. R. An overview of the methodological approach to the *in vitro* study of antiinfective biomaterials. *Int J Artif Organs.* v. 35, n. 10, p. 800-816, 2012.
- CARNEIRO, J. E. S.; GERALDINE, R. M.; SILVEIRA, M. F. A.; TORRES, M. C. L.; CARRIM, A. J. I.; SOUZA, A. R. M. Atividade antimicrobiana e propriedades físicas de filmes biodegradáveis incorporadas com cafeína e ácido acético. *Brazilian Journal of Development.* v. 6, n. 8, p. 60252-60262. 2020.
- CARVALHO, D. L. R. Modificação da superfície de poli(tetrafluoroetileno) para resistir a infecções nosocomiais de *Pseudomonas aeruginosa*. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências e Tecnologia - Universidade de Coimbra, Coimbra, 2014.
- CAVALCANTI, T. G.; SOUZA, A. F.; FERREIRA, G. F.; DIAS, D. S. B.; SEVERINO, L. S.; MORAIS, J. P. S.; SOUSA, K. A.; VASCONCELOS. U. Use of agro-industrial waste in the removal of phenanthrene and pyrene by microbial consortia in soil. *Waste Biomass Valor.* v.10, n. 1, p. 205-214, 2019.
- CHAKRABORTY, P.; DASTIDAR, D. G.; PAUL, P.; DUTTA, S.; BASU, D.; SHARMA, S. R.; BASU, S.; SARKER, R. K.; SEN, A.; SARKAR, A.; TRIBEDI, P. Inhibition of biofilm formation of *Pseudomonas aeruginosa* by caffeine: a potential approach for sustainable management of biofilm. *Arch Microbial.* v. 202, p. 623-635, 2020.
- CHALFOUN, S M; PEREIRA, M C; BATISTA, L R; ANGÉLICO, C L. Efeito da cafeína sobre o crescimento micelial de fungos associados ao café e produção de toxinas. Simpósio de pesquisa dos cafés do Brasil 2001. Embrapa Café. p. 181, Vitória, Espírito Santo. Brasil. 2001.

COLVIN, K. M., IRIE, Y., TART, C. S., URBANO, R., WHITNEY, J. C., RYDER, C., HOWELL, P. L., WOZNIAK, D. J., PARSEK, M. R. The Pel and Psl polysaccharides provide *Pseudomonas aeruginosa* structural redundancy within the biofilm matrix. *Environ Microbiol.* v. 14 (8), p. 1913-1928. 2012.

CONRAD, J.C.; GIBIANSKY, M. L.; JIN, F.; GORDON, V. D.; MOTTO, D. A.; MATHERWSON, M. A.; STOPKA, W. G.; ZELASKO, D. C.; SHROUT, J. D.; WONG, G. C. L. Flagella and Pili-mediated near-surface single-cell motility mechanisms in *P. aeruginosa*. *Biophysic J.* v.100. n. 7. p. 1608-1616. 2011.

DASH, S. S.; GUMMADI, S. N. Inhibitory effect of caffeine on growth of various bacterial strains. *Research J Microbiol.* v. 3, n. 6, p. 457-462, 2008.

DAVIES, J. C. *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis: pathogenesis and persistence. *Ped Resp Rev.* v. 3, n. 2, p. 128-134, 2002.

DE MARIA Y. Y. M.; GOMIDE L. M. M. Cafeína e café: A dualidade entre seus efeitos tóxicos e antioxidants. *Revista Intersaúde.* v. 1, n. 1, p. 73-85, 2019.

DESROUSSEAUX, C.; SAUTOU, V.; DESCAMPS, S.; TRAORÉ, O. Modification of the surfaces of medical devices to prevent microbial adhesion and biofilm formation. *J Hosp Infect.* v. 85, n. 1, p. 87-93, 2013.

DOTSEY, R. P.; MOSER, E. A. S.; ECKERT, G. J.; GREGORY, R. L. Effects of Cola-flavored bevarages and caffeine on *Streptococcus mutans* Biofilm formation and metabolic activity. *Journal Clin Pediatric Dent.* v. 41, n. 4, p. 294-299, 2017.

FIGUEREDO, A. C. F.; FREITAS, N. L.; DALMOLIN, T. V.; BRANDÃO, F. *Pseudomonas aeruginosa*: panorama do perfil de resistência aos carbapenêmicos no Brasil. *Brazilian Journal of Development.* v. 7, n. 1, p. 9661-9672, 2021.

FLEMMING, H. C.; WINGENDER, J. The biofilm matrix. *Nat Rev Microbiol.* v. 8, n. 9, p. 623–633. 2010.

FULCHER, N. B.; HOLLIDAY, P. M.; KLEM, E.; CANN, M. J.; WOLFGANG, M. C. The *Pseudomonas aeruginosa* Chp chemosensory system regulates intracellular cAMP levels by modulating adenylate cyclase activity. *Mol Microbiol.* v. 76, p. 889-904, 2010.

FUJII, S.; ASSUNÇÃO, F. G. A.; TANIWAKI, M. H.; SCHOLZ, M. B. S.; GÓMEZ, R. J. H. C.; HIROOKA, E. Y. Atividade fungística 'in vitro' de cafeína em fungos associados com grãos de café. *Acta Scientiarum Agronomy.* v. 26, n. 3, p. 279-285, 2004.

GAUR, V. K.; REGAR, R. K.; DHIMAN, N.; GAUTAM, K.; SRIVASTAVA, J. K.; PATNAIK, S.; KAMTHAN, M.; MANICKAM, N. Biosynthesis and characterization of sophorolipid biosurfactant by *Candida* spp.: Application as food emulsifier and antibacterial agente. *Bioresour Technol.* v. 285, p. 1-4, 2019.

GEBEYEHU, B.T.; BIKILA, S.L. Determination of caffeine content and antioxidant activity of coffee. *Am J Appl Chem.* v. 3, n. 2, p. 69-76, 2015.

GELLATLY, S. L.; HANCOCK, R. E. W. *Pseudomonas aeruginosa*: new insights into pathogenesis and host defenses. *Pathogens Dis.* v. 67, n. 3, p. 159-173, 2013.

GRAHAM, T.E., Caffeine and exercise: metabolism, endurance and performance. *Sports Med.* v. 31, n. 11, p. 785-807, 2001.

GUPTA, P.; SARKAR, S.; DAS, B.; BHATTACHARJEE, S.; TRIBEDI, P. Biofilm, pathogenesis and prevention - a journey to break the wall: a review. *Arch Microbiol.* v. 198, p. 1–15, 2016.

HADACEK, F., GREGER, H. Testing of antifungal natural products: methodologies, comparability of results and assay choice. *Phytochem Anal Int J Plant Chem Biochem Tech.* v. 11, n. 3, p. 137-147, 2000.

HAWVER, L. A., JUNG, S. A., & NG, W. L. Specificity and complexity in bacterial quorum-sensing systems. *FEMS Microbiol Rev.* v. 40, n. 5, p. 738-752. 2016.

- HARMSSEN, M.; YANG, L.; PAMP, S. J.; TOLKER-NIELSEN, T. An update on *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation, tolerance, and dispersal. *Immunol Med Microbiol.* v. 59, p. 253–268, 2010.
- HECKMAN, M. A.; WEIL, J.; MEJIA, E. G. Caffeine (1, 3, 7 – trimethylxanthine) in foods: A comprehensive review on consumption, functionality, safety, and regulatory matters. *J food Sci.* v. 75, n. 3, p. 77-87, 2010.
- HURLOW, J.; COUCH, K.; LAFORET, K.; BOLTON, L.; METCALF, D.; BOWLER, P. Biofilmes clínicos: uma fronteira desafiadora no tratamento de feridas. *Adv Ferida Cuidado.* n. 4. p. 295–301. 2015.
- JADEJA, N.; CHANGELA, D.; DANGAR, K.; BHATT, A.; RAVAL, M. An approach towards Quorum inhibition in pathogen *Pseudomonas aeruginosa* by herbal plant extracts and phytochemicals. *Proc Nat Conf Innovat Biol Sci.* p. 303-315, 2020.
- JAMAL, M.; AHMAD, W.; ANDLEEB, S.; JALIL, F.; IMRAN, M.; NAWAZ, M. A.; HUSSAIN, T.; ALI, M.; RAFIQ, M.; KAMIL, M. A. Bacterial biofilm and associated infections. *J Chinese Med Assoc.* v. 81, n. 1, p. 7–11, 2018.
- JIMENEZ, P. N., KOCH, G., THOMPSON, J. A., XAVIER, K. B., COOL, R. H., & QUAX, W. J. The multiple signaling systems regulating virulence in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiol Molec Biol Rev.* v. 76, p. 46-65, 2012.
- KABIR, F.; KATAYAMA, S.; TANJI, N.; NAKAMURA, S. Antimicrobial effects of chlorogenic acid and related compounds. *J Korean Soc Appl Biol Chem.* v. 57, p. 359–365, 2014.
- KAMARUZZAMAN, N.; TAN, L. P.; YAZID, K. A. M.; SAEED, S. I.; HAMDAN, R. H.; CHOONG, S. S.; WONG, W. K.; CHIVU, A.; GIBSON, A. J. Targeting the bacterial protective armour: Challenges and novel strategies in the treatment of the microbial biofilm. *Materials.* v. 11, n. 9, p. 1705, 2018.

KARATAN, E.; WATNICK, P. Signals, regulatory networks, and materials that build and break bacterial biofilms. *Microbiol Mol Biol.* v. 73. n. 2. p. 310–347. 2009.

KARIMINIK, A., BASERI-SALEHI, M., & KHEIRKHAH, B. *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing modulates immune responses: an updated review article. *Immunol Lett.* v.190, p. 1-6, 2017.

KAUFFMANN, C.; SOARES, A. P. V.; AROSSI, K.; PACHECO, L. A.; BUHL, B.; FREITAS, E. M.; HOEHNE, L.; CASTRO, L. C.; GNOATTO, S. C. B.; ETHUR, E. M. Potencial antimicrobiano e antibiofilme *in vitro* de espécies do gênero *Eugenia*, Myrtaceae, nativas do sul do Brasil. *Caderno Pedagógico.* v. 14, n. 2, p. 110-127, 2017.

KHARE, E.; ARORA, N. K. Dual activity of pyocyanin from *Pseudomonas aeruginosa* – antibiotic against phytopathogen and signal molecule for biofilm development by rhizobia. *Can J Microbiol.* v. 57, n. 9, p. 708-713, 2011.

KHAN, N.; MENDONCA, L.; DHARIWAL, A. FONTES, G.; MENZIES, D.; XIA, J.; DIVANGAHI, M.; KING, I. L. Intestinal dysbiosis compromises alveolar macrophage immunity to *Mycobacterium tuberculosis*. *Mucosal Immunol.* v. 12, n. 3, p. 772-783. 2019.

KHIDER, M.; HJERDE, E.; HANSEN, H.; WILLASSEN, N. P. Differential expression profiling of Δ litR and Δ rpoQ mutants reveals insight into QS regulation of motility, adhesion and Biofilm formation in *Aliivibrio salmonicida*. *BMC Genomics.* v. 20, n. 1, p. 1-18, 2019.

KUMAR S.; CHANDRA N.; SINGH L.; HASHMI M Z.; VARMA A. Biofilms in human diseases: treatment and control. 2019.

LARSSON, D. G. J.; FLACH, C-F. Antibiotic resistance in the environment. *Nat Rev Microbiol.* v. 20, n. 5, p. 257-269, 2022.

- LEIGHTON, T. L.; BUENSUCESO, R. N. C.; HOWELL, P. L.; BURROWS, L. L. Biogenesis of *Pseudomonas aeruginosa* type IV pili and regulation of their function. *Environ Microbiol.* v. 17, n. 11, p. 4148-4163, 2015.
- LOU, Z.; WANG, H.; ZHU, S.; MA, C.; WANG, Z. Antibacterial activity and mechanism of action of chlorogenic acid. *J Food Sci.* v. 76, p. 398-403, 2011.
- LU, L.; ZHAO, Y.; YI, G.; LI, M.; LIAO, L.; YANG, C.; CHO, C.; ZHANG, B.; ZHU, J.; ZOU, K.; CHENG, Q. Quinic acid: a potential antibiofilm agent against clinical resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Chin Med.* v.16, n. 72, p. 1-17, 2021.
- LUO, Y.; ZHAO, K.; BAKER, A. E.; KUCHMA, S. L.; COGGAN, K. A.; WOLFGANG, M. C.; WONG, C. L.; O'TOOLE, G. A. A Hierarchical cascade of second messengers regulates *Pseudomonas aeruginosa* surface behaviors. *MBio* v. 6, p. 1-11, 2015.
- MANN, E. E.; WOZNIAK, D. J. *Pseudomonas* biofilm matrix composition and niche biology. *FEMS Microbiology Reviews.* v. 36, p. 893-916, 2012.
- MELANDA, H. C. C. Biofilmes e plantas medicinais: evidência científica. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Medicina. Universidade de Coimbra. Coimbra. 2019.
- MOGHADDAM, M. M.; KHODI, S.; MIRHOSSEINI, A. Quorum Sensing in Bacteria and a Glance on *Pseudomonas aeruginosa*. *Clin Microbiol.* v. 3, n. 4, p. 1-10, 2014.
- MOORMEIER, D. E.; BAYLES, K. W. *Staphylococcus aureus* Biofilm: A complex development organism. *Molec Microbiol.* v. 104, n. 3, p. 365–376, 2017.
- MORADALI, M. F.; GHODS S.; REHM, B.H. *Pseudomonas aeruginosa* lifestyle: a paradigm for adaptation, survival, and persistence. *Front Cell Infect Microbiol.* v. 7, n. 39, 2017.
- MULCAHY, L. R.; VINCENT, I.M.; LEWIS, K. *Pseudomonas aeruginosa* biofilms in disease. *Microb Ecol.* v. 68, n. 1, p. 1-12, 2014.

NETO, J. A. R., et al. Susceptibilidade das formas imaturas de *Culex Quinquefasciatus* expostas a diferentes concentrações de cafeína e pó de guaraná (*Paullinea cupana*). *Revista Eletrônica de Ciências*, v. 5, n. 1, p. 66–74, 2012.

NEVES, M. L. da R.; NUNES, L. E.; ROCHA, W. R. V. da.; XIMENES, E. C. P. de A.; ALBUQUERQUE, M. C. P. de A. The influence of the quorum sensing on the formation of biofilm by *Pseudomonas aeruginosa*. *Res Soc Develop*. v. 10, s. 1, n. 2, p. 1-10, 2021.

NORAT, C. E. T.; PRAGANA, L. G.; JARAMILLO, L. Y. A.; TRAVASSOS R. A.; VASCONCELOS, U. Hydrocarbonoclastic activity in bacterial biofilms: a systematic study emphasizing pseudomonads. *Conjecturas*. v. 12, n. 22, p. 548-562, 2022.

OLIVEIRA, A. D. L.; VASCONCELOS, U.; CALAZANS, G. M. T. Detection of potential pathogenic *Pseudomonas aeruginosa* in a hospital water system. *Res J Pharm Biol Chem Sci*. v. 12, n. 4, p. 132-139, 2021.

PAGANO, P. J.; BUCHANAN, L. V.; DAILEY, C. F.; HAAS, J. V.; ENK, R. A. V.; GIBSON, J. K. Effects of linezolid on *Staphylococcal* adherence versus time of treatment. *Int J Antimicrob Agents*. v. 23, p. 226–234, 2004.

PALLERONI, N. J. *Pseudomonas* Bergey's manual of systematics of archaea and bacteria. 2015.

PALMER, J.; FLINT, S.; BROOKS, J. Bacterial cell attachment, the beginning of a biofilm. *J Ind Microbiol Biotechnol*. v. 34, n. 9, p. 577-588, 2007.

PANG, Z.; RAUDONIS, R.; GLICK, B. R.; LIN, T. J.; CHENG, Z. Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: mechanisms and alternative therapeutic strategies. *Biotechnol Adv*. v. 37, n. 1, p. 177-192, 2019.

PEIXOTO, M. M.; GRESSLER, L. T.; SUTILI, F. J.; COSTA, M. M.; VARGAS, A. C. Action of products based on chlorhexidine and iodine for the adhesion and consolidated

biofilm of *Staphylococcus* spp. isolated from milk. *Pesq Vet Bras.* v. 35, p. 105-109, 2015.

PEREIRA, D. S.; FREITAS, C. I. A.; FREITAS, M. O.; MARACAJÁ, P. B.; SILVA, J. B. A.; SILVA, R. A.; SILVEIRA, D. C. Histórico e principais usos da própolis apícola. *Agropecuária Científica no Semiárido.* v. 11, n. 2, p. 01-21, 2015.

PETROV, A.; LOMBARDO, S.; AUDETTE, G. F. Fibril-mediated oligomerization of pili-derived protein nanotubes. *Journal of Nanobiotechnology.* v. 11. n. 24. p. 1-10. 2013.

PFALLER, M. A., RHINE-CHALBERG, J.; BARRY, A. L.; REX, J. H. Strain variation and antifungal susceptibility among bloodstream isolates of *Candida* species from 21 different medical institutions. *Clin Infect Dis.* v. 21, p. 1507–1509, 1995.

RASHID, M. H.; KORNBERG, A. Inorganic polyphosphate is needed for swimming, swarming and twitching motilities of *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* v. 97, n. 9, p. 4885-4890, 2000.

RAMANAVICIENE, A.; MOSTOVOJUS, V.; BACHMATOVA, I.; RAMANAVICIUS, A. Antibacterial effect of caffeine on *Escherichia coli* and *Pseudomonas fluorescens*. *Acta Med Litu.* v. 4, n. 10, p. 185–188, 2003.

RODRIGUES, L. B.; SANTOS, L. R.; TAGLIARI, V. Z.; RIZZO, N. N.; TRENHAGO, G.; OLIVEIRA, A. P.; GOETZ, F.; NASCIMENTO, V. P. Quantification of biofilm production on polystyrene by *Listeria*, *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* isolated from a poultry slaughterhouse. *Braz J Microbiol.* v. 41, p. 1082-1085, 2010.

ROMLING U.; BALSALOBRE C. Biofilm infections, their resilience to therapy and innovative treatment strategies. *J Intern Med.* v. 272, p. 541–561, 2012.

ROSSI, C.; SERIO, A.; LÓPEZ, C. C.; ANNIBALLI, F.; AURICCHIO, B.; GOFFREDO, E.; GOGA, B. T. C.; LISTA, F.; FILLO, S.; PAPARELLA, A. Biofilm

formation, pigment production and motility in *Pseudomonas* spp, isolated from the dairy industry. *Food Control*. v. 86, p. 241-248, 2018.

RYDER, C., BYRD, M., WOZNIAK, D. J. Role of polysaccharides in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *Curr Opin Microbiol*. v. 10, n. 6, p. 644-648, 2007.

SANTOS, P. B. R. E.; ÁVILA, D. S.; RAMOS, L. P.; YU, A. R.; SANTOS, C. E. R.; BERRETTA, A. A.; CAMARGO, S. E. A.; OLIVEIRA, J. R.; OLIVEIRA, L. D. Effects of Brazilian green propolis extract on planktonic cells and biofilms of multidrug resistant strains of *Klebsiella pneumoniae* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Biofouling*. v. 36, n. 7, doi: 10.1080/08927014.2020.1823972, 2020.

SARRAZIN, C.; LEQUÉRE, J. L.; GRETSCH, C.; LIARDON, R. Representativeness of coffee aroma extracts: a comparison of different extraction methods, *Food Chem*. v.70, p.99-106, 2000.

SHASTRY, R. P.; KANEKAR, S.; PANDIAL, A. S.; REKHA, P. D. Isoeugenol suppresses multiple quorum sensing regulated phenotypes and biofilm formation of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Nat Product Res*. v. 36, n. 6, p. 1663-1667, 2022.

SILVA, R.L. Utilização do peptídeo sintético Aureína K como adjuvante na atividade antimicrobiana de ciprofloxacina contra *Pseudomonas aeruginosa* atcc 9027. 93 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Campus de Sobral, Universidade Federal do Ceará, Sobral, 2017.

SILVÉRIO, R. A. Estado da arte da entomotoxicologia forense com ênfase em díptera (insecta) e estudo preliminar da ação da cafeína no ciclo de vida de *Sarconesia chlorogaster* (Diptera: Calliphoridae) sob condições de laboratório. 2008.

SIRYAPORN, A.; KUCHMA, S. L.; O'TOOLE, G. A.; GITAI, Z. Surface attachment induces *Pseudomonas aeruginosa* virulence. *Proc Natl Acad Sci*. v. 111, n. 47, p. 16860-16865, 2014.

SLEYTR, U. B. Pesquisa básica e aplicada em camada S: uma visão geral. *FEMS Microbiol.* v. 20, p. 5–12, 1997.

SOMMER, R.; ROX, K.; WAGNER, S.; HAUCK, D.; HENRIKUS, S. S.; NEWSAD, S.; ARNOLD, T.; RYCKMANS, T.; BRONSTRUP, M.; IMBERTY, A.; VARROT, A.; HARTMANN, R. W.; TITZ, A. Agentes anti-biofilme contra *Pseudomonas aeruginosa*: um estudo de relação estrutura-atividade de inibidores de LecB C-glicosídicos. *J Med Chem.* v. 62, n. 20, p. 9201-9216, 2019.

SOUZA, I. A.; GARCIA, D. O.; ANVERSA, L.; KATSUKO, R.; KOBAYASHI, T.; NAKAZATO, G.; SAEKI, E. K. Análise comparativa dos fatores de virulência dos isolados clínicos e ambientais de *Pseudomonas aeruginosa*. *Colloquium Vitae.* v. 11, n. 3, p. 41-50, 2019.

SPENCER D H.; KAS A.; SMITH E E.; RAYMOND C K.; SIMS E. H.; HASTINGS, M.; BURNS, J. L.; KAUL, R.; OLSON, M. V. Whole-genome sequence variation among multiple isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol.* v. 185, p. 1316-1325, 2003.

STREVETT, K. A.; CHEN, G. Microbial surface thermodynamics and applications. *Research in Microbiology.* v. 154, n. 5, p. 329-335, 2003.

SUDHAKAR, S. KARPAGAM, S. SHIYAMA. Analysis of pyocyanin compound and its antagonistic activity against phytopathogens. *Int J Chem Technol Res.* v. 5. p. 1101–1106. 2013.

TAN, Q., AI, Q., XU, Q., LI, F., YU, J. Polymorphonuclear leukocytes or hydrogen peroxide enhance biofilm development of mucoid *Pseudomonas aeruginosa*. *Mediators of inflammation.* v. 2018, p. 1-14, doi: 10.1155/2018/8151362, 2018.

TEIXEIRA, P.; LOPES, Z.; AZEREDO, J.; OLIVEIRA, R.; VIEIRA, M. J. Physico-chemical surface characterization of a bacterial population isolated from a milking machine. *Food Machine.* v. 22, p. 247-251, 2005.

THI, M.T.T.; WIBOWO, D.; REHM, B. H. A. *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Int. J. Mol. Sci.* v. 21, n. 22, p. 1-25, 2020.

TOLEDO, E.M.; SIQUEIRA, A.B.; SANTOSA, T.V.; RIBEIRO, F.S.; CAMARGO, A.J.; OLIVEIRA, S.S. Estudo Teórico dos Parâmetros Estruturais da Cafeína no Vácuo Usando Dinâmica Molecular de Car-Parrinello. *Rev Proc Quím.* v. 11, n. 21, p. 17-24, 2017.

TOLKER-NIELSEN T. *Pseudomonas aeruginosa* biofilm infections: from molecular biofilm biology to new treatment possibilities. *APMIS Suppl.* n. 138, p. 1-51, 2014.

TURNBULL, D.; RODRICKS, J.V.; MARIANO, G.F.; CHOWDHURY, F. Caffeine and cardiovascular health. *Reg Toxicol Pharmacol.* v. 89, p. 165-185, 2017.

UBBINK, J.; ZAMMARETTI, P. S. Colloidal properties and specific interactions of bacterial surfaces. *Curr Opin Colloid Interf Sci.* v. 12, n. 4, p. 263-270, 2007.

WIN, Y. Y.; SINGH, M.; SADIQ, M. B.; ANAL, A. K. Isolation and identification of caffeine-degrading bacteria from coffee plantation area. *Food Biotechnol.* v. 33, n. 2, p. 109–124, 2019.

WHITELEY, M.; BANGERA, M. G.; BUMGARNER, R. E.; PARSEK, M. R.; TEITZEL, G. M.; LORY, S. Expressão gênica em biofilmes de *Pseudomonas aeruginosa*. *Nature.* v. 413, p. 860–864. 2001.

WHO. Antibacterial agents in clinical development: an analysis of the antibacterial clinical development pipeline, including tuberculosis. Geneva: World Health Organization; 2017.

YANG, A.; TANG, W. S.; SI, T.; TANG, J. X. Influence of physical effects on the swarming motility of *Pseudomonas aeruginosa*. *Biophys J.* v. 112, n. 7, p. 1462-1471. 2017.

ZANDONÁ, G. P. Extratos de folhas de araçazeiro (*Psidium cattleianum* Sabine) e de butiazeiro (*Butia odorata*) (Barb. Rodr.) Noblick & Lorenzi, obtidos por infusão aquosa e por extração com líquido pressurizado: descrição fitoquímica e prospecção de propriedades. Tese (Doutorado) – Pós Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos da Faculdade de Agronomia ‘Eliseu Maciel’ - Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2021.

ZINEB, G.; MOSTAFA, M. E.; YOUSSEF, G.; ABDELLATIF, K.; SALWA, O.; ABDELLAH, H.; SAAD, I.; NAIMA, E.; MOHAMMED, T. Anti-Adhesion and anti-Biofilm effectiveness of disinfectants used in hemodialysis Against both *Staphylococcus warneri* and *Staphylococcus sciuri* biofilms. *Int J Eng Res Appl.* v. 4, p. 86-92, 2014.

ZHOU G.; PENG H.; WANG, Y.; HUANG, X.; XIE, X.; SHI, Q. Enhanced synergistic effects of xylitol and isothiazolones for inhibition of initial biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 and *Staphylococcus aureus* ATCC 6538. *J Oral Sci.* v. 61, n. 2, p. 255-263, 2019.

ZHONG, H.; JIANG, Y.; ZENG, G.; LIU, Z.; LIU, L.; LIU, Y.; YANG, X.; LAI, M.; HE, Y. Effect of low concentration rhamnolipid on adsorption of *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 on hydrophilic and hydrophobic surfaces. *J Hazard Mater.* v.285, p. 383-388, 2015.