



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA, IMUNOLOGIA E PARASITOLOGIA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA E BIOCÊNCIAS

AMANDA KELLY FERREIRA SOUSA

**REDUÇÃO DE BIOFILME DE *Pseudomonas aeruginosa* MEDIADA POR
BACTERIÓFAGOS VISANDO APLICAÇÃO EM ELEMENTOS DE TITÂNIO**

FLORIANÓPOLIS – SC

2023

AMANDA KELLY FERREIRA SOUSA

REDUÇÃO DE BIOFILME DE *Pseudomonas aeruginosa* MEDIADA POR
BACTERIÓFAGOS VISANDO APLICAÇÃO EM ELEMENTOS DE TITÂNIO

Dissertação de Mestrado submetida à banca examinadora do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biociências da Universidade Federal de Santa Catarina, como requisito para obtenção do título de Mestra em Biotecnologia e Biociências.

Orientadora: Prof.^a Dra. Gislaine Fongaro.

Coorientadora: Prof.^a Dra. Maria Célia da Silva Lanna.

FLORIANÓPOLIS – SC

2023

Sousa, Amanda Kelly Ferreira

Redução de biofilme de *Pseudomonas aeruginosa* mediada por bacteriófagos visando aplicação em elementos de titânio / Amanda Kelly Ferreira Sousa ; orientador, Gislaine Fongaro, coorientador, Maria Célia da Silva Lanna, 2023.

128 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biociências, Florianópolis, 2023.

Inclui referências.

1. Biotecnologia e Biociências. 2. *Pseudomonas aeruginosa*. 3. Bacteriófagos. 4. Biofilmes. 5. Titânio. I. Fongaro, Gislaine. II. Lanna, Maria Célia da Silva. III. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biociências. IV. Título.

AMANDA KELLY FERREIRA SOUSA
REDUÇÃO DE BIOFILME DE *Pseudomonas aeruginosa* MEDIADA POR
BACTERIÓFAGOS VISANDO APLICAÇÃO EM ELEMENTOS DE TITÂNIO

O presente trabalho em nível de Mestrado foi avaliado e aprovado, em 28 de outubro de 2023,
pela banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof. Dr. Aguinaldo Roberto Pinto
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof.^a Dra. Ariadne Cristiane Cabral da Cruz
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. Dr. Mario Steindel
Universidade Federal de Santa Catarina
(Membro Suplente)

Prof. Dra. Maria Luiza Bazzo
Universidade Federal de Santa Catarina
(Membro Suplente)

Profa. Dra. Maria Célia da Silva Lanna
(Coorientadora/ Universidade Federal de Ouro Preto-UFOP)

Certificamos que esta é a versão original e final do trabalho de conclusão que foi julgado
adequado para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia e Biociências.

Prof. Dr. Aguinaldo Roberto Pinto
(Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biociências)

Prof.^a Dra. Gislaine Fongaro
(Orientadora)

Florianópolis, 2023.

Dedico esta dissertação de mestrado à força motriz por trás de todos os meus esforços e conquistas, meus amados pais, Regiana e Sebastião, cujo amor inabalável, apoio incondicional e sacrifícios incansáveis me permitiram alçar longos voos.

Minha vida e cada página desse trabalho são dedicadas a vocês...

Com todo meu amor, carinho e gratidão.

AGRADECIMENTOS

Desafio tão grande quanto escrever esse trabalho, foi a trajetória percorrida para que esse momento pudesse ser possível. Composta de várias etapas nas quais encontrei muitas dificuldades, mas também muitas superações. E é com o auxílio da minha família, dos amigos e colegas, que contribuíram de forma direta e indireta, que hoje essa trajetória está chegando ao fim. Expresso, por isso, a todos a minha mais profunda gratidão.

A Deus, porque cuidas de mim, mesmo que eu ande pelo vale e o atravesse à sombra da morte, sei que estás do meu lado. Pois seu amor é como a rocha que não se quebra jamais, é como o sol que nasce toda manhã, me ergue, fortalece e me dá vida.

Aos meus pais, Regiana e Sebastião, força propulsora da minha vida, meus maiores incentivadores, que renunciaram a tantas coisas para me proporcionarem tudo que precisei e, me fazem acreditar que eu posso e devo chegar cada vez mais longe, que me orientam nos momentos de aflição, medo, angústia e indecisão. Que bom tê-los nessa vida e aprender com vocês de tantas formas, todos os dias. Obrigada por me ensinarem desde pequena a amar as coisas mais simples e ver graça e paz nelas, a crescer sem medo de mostrar o meu lado mais humano. Que sorte a gente se ter de um jeito tão inteiro nessa vida. Que o amor continue sempre sendo, o artigo de luxo da nossa casa.

Aos meus familiares, em especial minhas tias Adriana, Regilane e Renata, aos meus primos, por serem sempre presentes na minha vida. Acho que Deus nos dá a oportunidade de viver em família para conhecer o amor incondicional, esse amor que recebi e recebo de tantas formas. Para a gente teve muita cura, muitos desafios e em todos eles nunca me sentir sozinha. A pessoa que sou vem do reflexo do que somos enquanto família, obrigada por isso.

À minha avó, Carolina (*in memoriam*) que mesmo ausente, se faz tão presente em meu coração e em minhas lembranças. Não há um dia em minha vida que não penso em ti, a lembrança do seu sorriso, sua força, não me deixaram desanimar, seus ensinamentos e valores alimentaram minha alma e conduziram meus passos até aqui. Ao meu avô Juvenal, exemplo de honestidade e simplicidade pela presença constante em minha vida.

Aos meus amigos, Viviani, Anderson, Miguel, Gabriel e Joana, com vocês me sinto em casa, no cômodo mais confortável, onde relógios não existem porque o tempo parece outro. Hoje, meu presente é gratidão, por esse laço respeitoso que criamos, que me fez colecionar asas, sorrisos e histórias. Obrigada pelos cuidados e carinhos sem esforços e recompensa. Obrigada por terem estado comigo por inteiro, nos vazios e nos excessos. A amizade de vocês me motivou a seguir, a tirar forças de lugares que eu nem sabia que existia. Sozinha eu não teria construído a beleza que agora existe. Se foi possível até aqui, é porque vocês estiveram comigo. Que continuemos assim, sempre perto, mesmo quando não.

A minha família do coração Cris, Anna, Lorenzo, Sávio, Lúcia e família, por todo amor, carinho, preocupação, incentivo e força. Vocês foram essenciais em todo o processo longe de casa.

Ao Laboratório de Virologia Aplicada por toda infraestrutura e oportunidade, por me permitirem crescer como pessoa e profissional, obrigada por tudo que me foi ensinado.

As grandes amizades que fiz durante o mestrado, especialmente, Arthur, Yasmin G, Estevão, Helena, Theo, Yasmim J, Lois, Carla, Nati e Aline. O carinho, amizade e companheirismo de vocês, contribuíram valiosamente para minha trajetória acadêmica. Obrigada pelas palavras de encorajamento e apoio.

À minha orientadora Prof.a Dra. Gislaine Fongaro, de forma muito carinhosa, eu deixo uma palavra de gratidão porque reconheço a paciência, esforço, zelo e carinho maternal, por ter acreditado em mim, pelos conselhos pessoais e profissionais, pela sua incansável dedicação, pela escolha de doar, o que eu considero dos bens mais caros para o mundo de hoje, seu tempo, seu conhecimento. Além disso, por ser meu exemplo de ética, persistência, dedicação, de pessoa e profissional a qual sempre fará parte da minha vida.

À minha coorientadora, Prof.a. Dra. Maria Célia da Silva Lanna, por todas as oportunidades, principalmente pela confiança depositada no meu crescimento acadêmico, pelo incentivo, pelos cuidados de mãe, apoio nos momentos de fraqueza, por sempre se fazer presente na minha vida desde 2016. Sou grata por todo o caminho que juntas percorremos.

À banca examinadora, Prof. Dr. Aguinaldo, Prof.a. Dra. Ariadne, Prof. Dr. Mario Steindel e Prof.a. Dra. Maria Luiza, também a Dra. Raquel por aceitarem o convite, pelo interesse e disponibilidade em contribuir com este trabalho.

Ao corpo técnico (especialmente, Eliana LCME), professores (de modo especial, Prof.a. Dra. Patrícia Stoco), profissionais da limpeza e demais membros da Universidade Federal de Santa Catarina pela disponibilidade, receptividade e apoio necessário ao trabalho.

Aos laboratórios parceiros por não imporem empecilhos, propiciando todos os meios necessários ao desenvolvimento dessa pesquisa.

À Universidade Federal de Santa Catarina e ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biociências pela estrutura e ensino de qualidade.

A todos os que estão permanentemente em mim e me veem, até quando eu mesma não me vejo e não me reconheço. A todos os que me ensinaram a descobrir como ser quem sou, que habitam o meu olhar, meu sorriso e minha voz. A todos que me honraram por ser parte da vida deles, agradeço. Familiares, amigos, irmãos, pacientes, professores, colegas, meus pares e até meus ímpares. Sou quem sou por eles, pelo olhar deles, na história deles e, agora na nossa história. Tudo vivido até aqui, se tornará saudade, aliviando um pouco a cada dia que posso ser quem sou: a continuidade do que aprendi com todos os encontros. Que assim seja em todas as histórias lindas de viver e de morrer.

Meu coração generosamente se preenche de gratidão.

“Somos assim: sonhamos o voo, mas tememos a altura. Para voar é preciso ter coragem para enfrentar o terror do vazio. Porque é só no vazio que o voo acontece. O vazio é o espaço da liberdade, a ausência de certezas. Mas isso é o que tememos: o não ter certezas. Por isso, trocamos o voo por gaiolas. As gaiolas são o lugar onde as certezas moram.”

Rubem Alves.

RESUMO

Pseudomonas aeruginosa é uma bactéria patogênica que tem demonstrado uma notável capacidade de formar biofilmes em superfícies, apresentando desafios significativos na prevenção e tratamento de infecções relacionadas a dispositivos biomédicos e na indústria biomédica. Portanto, a problemática dos biofilmes em dispositivos biomédicos compostos por titânio é multifacetada, envolvendo preocupações de saúde, resistência a antibióticos, desafios de limpeza e esterilização dos procedimentos médicos-odontológicos e a qualidade de vida dos pacientes. Assim, este estudo investigou o potencial dos bacteriófagos PABP2, PAPB5, PAPB7, PAT4 e PAS2 isolados de cultura clínica, em três dosagens de multiplicidade de infecção (MOI): dose mínima (0,01), dose intermediária (0,1) e dose alta (1), como agentes terapêuticos na desagregação, destruição e prevenção a formação de biofilmes em superfícies abióticas compostas por titânio. Realizou-se dois experimentos independentes e destrutivos: o experimento 1 – avaliou a capacidade dos bacteriófagos de desagregar e destruir biofilmes bacterianos já estabelecidos, enquanto o experimento 2 – investigou a atividade profilática dos bacteriófagos na prevenção da formação do biofilme. Como metodologia foram realizadas análises microbiológicas, ensaio de eficácia, avaliação de concentração patógeno-hospedeiro e o impacto nas células bacterianas, por meio de contagem de células viáveis e Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV). Os dados foram submetidos à *Two-Way* ANOVA (p-valor <0,05) para comparação dos grupos amostrais tratado e não tratado, *post-hoc* Tukey com intervalo de confiança 95% (p<0,05). Os dados foram apresentados como médias de três experimentos independentes e desvios padrão. Todos os fagos foram efetivos na redução de células viáveis, destruição e prevenção de biofilme em 100 % da superfície tratada. Todavia, a atividade profilática obteve maior eficiência para os 5 bacteriófagos aplicados (p<0,05), não permitindo a efetivação do biofilme. Contudo, vale ressaltar que os resultados não revelaram um padrão consistente em relação à dose-dependência e às variações entre hospedeiros, o que torna difícil inferir uma relação causa-efeito clara. Desta forma, conclui-se, que a atividade lítica no biofilme de *Pseudomonas aeruginosa* formado por cepas clínica e ATCC® 27853™ multirresistentes indica que os bacteriófagos e a terapia fágica utilizados neste estudo podem contribuir para o desenvolvimento de abordagens terapêuticas e profiláticas inovadoras na luta contra infecções associadas a dispositivos biomédicos e biofilmes de *Pseudomonas aeruginosa*. Além disso, os resultados têm o potencial de informar futuras aplicações clínicas e industriais visando à segurança e eficácia em dispositivos biomédicos e implantes de titânio.

Palavras-chave: *Pseudomonas aeruginosa*. Bacteriófagos. Titânio. Implantes. Próteses. Biofilmes. Multirresistência. Infecções nosocomiais. Dispositivos biomédicos. Terapia profilática.

ABSTRACT

Pseudomonas aeruginosa is a pathogenic bacterium that has demonstrated a remarkable ability to form biofilms on surfaces, presenting significant challenges in the prevention and treatment of infections related to biomedical devices and in the biomedical industry. Therefore, the problem of biofilms on biomedical devices composed of titanium is multifaceted, involving health concerns, antibiotic resistance, cleaning and sterilization challenges of medical-dental procedures and the quality of life of patients. Thus, this study investigated the potential of the bacteriophages PABP2, PABP5, PABP7, PAT4 and PAS2 isolated from clinical culture, at three multiplicity of infection (MOI) doses: minimum dose (0.01), intermediate dose (0.1) and high dose (1), as therapeutic agents in the disaggregation, destruction and prevention of biofilm formation on abiotic surfaces composed of titanium. Two independent and destructive experiments were carried out: experiment 1 – evaluated the ability of bacteriophages to disaggregate and destroy already established bacterial biofilms, while experiment 2 – investigated the prophylactic activity of bacteriophages in preventing biofilm formation. As a methodology, microbiological analysis, efficacy assay, evaluation of pathogen-host concentration and the impact on bacterial cells were carried out, through viable cell counting and Scanning Electron Microscopy (SEM). The data were submitted to Two-Way ANOVA (p-value <0.05) to compare the treated and untreated sample groups, post-hoc Tukey with 95% confidence interval (p<0.05). Data were presented as means of three independent experiments and standard deviations. All phages were effective in reducing viable cells, destroying and preventing biofilm on 100% of the treated surface. However, the prophylactic activity was more efficient for the 5 bacteriophages applied (p<0.05), not allowing the biofilm to form. However, it is worth highlighting that the results did not reveal a consistent pattern in relation to dose-dependence and variations between hosts, which makes it difficult to infer a clear cause-effect relationship. Therefore, it is concluded that the lytic activity in the *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formed by multiresistant clinical and ATCC® 27853™ strains indicates that the bacteriophages and phage therapy used in this study can contribute to the development of innovative therapeutic and prophylactic approaches in fights infections associated with biomedical devices and *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. Furthermore, the results have the potential to inform future clinical and industrial applications targeting safety and efficacy in biomedical devices and titanium implants.

Keywords: *Pseudomonas aeruginosa*. Bacteriophages. Titanium. Implants. Prostheses. Biofilms. Multidrug resistance. Nosocomial infections. Biomedical devices. Prophylactic therapy.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – História da descoberta da <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	17
Figura 2 – Patógenos prioritários.....	19
Figura 3 – Virulência e fatores de patogenicidade de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	21
Figura 4 – Possíveis causas para a resistência da <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	22
Figura 5 – Implicações clínicas da <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	24
Figura 6 – Locais de infecções nosocomiais.....	25
Figura 7 – Diagnóstico de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	27
Figura 8 – Novas abordagens para o combate de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	28
Figura 9 – Histórico: Estudo dos biofilmes.....	30
Figura 10 – Processo de formação do biofilme bacteriano.....	31
Figura 11 – Principais diferenças entre bactérias planctônicas e sésseis.....	32
Figura 12 – Principais interações na adesão celular bacteriana reversível à superfície abiótica.....	34
Figura 13 – Adesão bacteriana em dispositivos biomédicos.....	35
Figura 14 – Tríade da interação multifacetada da adesão bacteriana.....	36
Figura 15 - Fatores influenciadores da adesão bacteriana.	36
Figura 16 – Principais infecções causadas e agravadas pela formação de biofilmes bacterianos.....	37
Figura 17 – Microrganismos de importância clínica formadores de biofilme.....	41
Figura 18 – Alvos terapêuticos anti-biofilme por fase de formação.....	42
Figura 19 – Aplicabilidade e características dos dispositivos biomédicos implantáveis.....	45
Figura 20 - Evolução no desenvolvimento e utilização de biomateriais.....	48
Figura 22 - Caracterização dos bacteriófagos.....	52

Figura 23 – Ciclo de vida dos bacteriófagos.....	55
Figura 24 – Áreas de aplicações dos bacteriófagos.....	56
Figura 25 – Modelo experimental de binarização das micrografias para estimativa da redução percentual do biofilme de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> em superfície de titânio.....	58
Figura 26 – Ensaio de formação de biofilme de cepas de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> em placas de microtitulação de poliestireno pelo método de Cristal violeta.....	66
Figura 27 – Células viáveis de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> recuperadas do biofilme aderido a superfície de elementos de titânio após tratamento com o bacteriófago PAPB2 em diferentes concentrações.....	72
Figura 28 – Células viáveis de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> recuperadas do biofilme maduro aderido à superfície de elementos de titânio após tratamento com o bacteriófago PAPB5 em diferentes concentrações.....	73
Figura 29 – Células viáveis de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> recuperadas do biofilme maduro aderido à superfície de elementos de titânio após tratamento com o bacteriófago PAPB7 em diferentes concentrações.....	74
Figura 30 – Células viáveis de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> recuperadas do biofilme maduro aderido à superfície de elementos de titânio após tratamento com o bacteriófago PAS2 em diferentes concentrações.....	75
Figura 31 – Células viáveis de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> recuperadas do biofilme maduro aderido à superfície de elementos de titânio após tratamento com o bacteriófago PAT4 em diferentes concentrações.....	76
Figura 32 – Micrografia dos controles experimentais: <i>Pseudomonas aeruginosa</i> clínica.....	77
Figura 33 – Micrografia dos controles experimentais: <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC® 27853™.....	77
Figura 34 – Avaliação da atividade de desagregação e destruição do biofilme de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> clínica em superfície de elementos de titânio, em ordem crescente de multiplicidade de infecção.....	79
Figura 35 – Avaliação da atividade de desagregação e destruição do biofilme de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC® 27853™ em superfície de elementos de titânio, em ordem crescente de multiplicidade de infecção.....	81
Figura 36 – Células viáveis de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> recuperadas do biofilme antes e depois da aplicação profilática do bacteriófago PAPB2 na superfície de elementos de titânio..	86
Figura 37 – Células viáveis de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> recuperadas do biofilme antes e depois da aplicação profilática do bacteriófago PAPB5 na superfície de elementos de titânio..	87

Figura 38 – Células viáveis de *Pseudomonas aeruginosa* recuperadas do biofilme antes e depois da aplicação profilática do bacteriófago **PAS2** na superfície de elementos de titânio.....87

Figura 39 – Células viáveis de *Pseudomonas aeruginosa* recuperadas do biofilme antes e depois da aplicação profilática do bacteriófago **PAT4** na superfície de elementos de titânio....89

Figura 40 - Avaliação da atividade profilática de bacteriófagos na formação de biofilme de *Pseudomonas aeruginosa* **ATCC® 27853™** em superfície de elementos de titânio, em ordem crescente de multiplicidade de infecção.....90

Figura 41 - Avaliação da atividade profilática de bacteriófagos na formação de biofilme de *Pseudomonas aeruginosa* clínica em superfície de elementos de titânio, em ordem crescente de multiplicidade de infecção.....91

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Perfil de sensibilidade microbiana da cepa clínica de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC® 27853™	68
Tabela 2 – Perfil de sensibilidade microbiana da cepa clínica de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ..	69
Tabela 3 – Caracterização dos corpos de prova.....	71
Tabela 4 – Redução percentual do biofilme de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> em superfície dos elementos de titânio por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).....	83
Tabela 5 – Células viáveis recuperadas de biofilme de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> em superfície de titânio pós-tratamento profilático com bacteriófagos em diferentes concentrações.....	85

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA	Análise de Variância
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
BHI	Brain Heart Infusion
C+	Controle positivo
C-	Controle negativo
CEPID	Centro de Ensino e Pesquisas em Implantes Dentários
DMI	Dispositivos Médicos Implantáveis
DO	Densidade Ótica
e-DNA	DNA extracelular
EI	Evidência Insuficiente
FAGO	Bacteriófago
HMDS	Hexametildisilano
HU	Hospital Universitário
ISO	<i>International Organization for Standardization</i>
LBMMS	Laboratório de Biologia Molecular, Microbiologia e Sorologia
LCME	Laboratório Central de Microscopia Eletrônica
LVA	Laboratório de Virologia Aplicada
mm	Milímetro
mm ²	Milímetro quadrado
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
MET	Microscopia Eletrônica de Transmissão
MOI	<i>Multiplicity of infection</i>
N/A	Não se Aplica
NHI	<i>National Institute of Health</i>
nm	Nanômetro
OMS	Organização Mundial da Saúde
P.A	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
PB	<i>Proximal bone</i>
pH	Potencial Hidrogeniônico
QS	<i>quorum sensing</i>
R	Resistente
S	Sensível

S	<i>Skin</i>
ssp.	Subespécie
T	<i>Tendon</i>
TIFF	Tag Image File Format
UFC	Unidade Formadora de Colônia
UFP	Universidade Formado de Placa
UFOP	Universidade Federal de Ouro Preto
UFSC	Universidade Federal de Santa Catarina
SCOPE	<i>Surveillance and control of pathogens of epidemiological importance</i>

LISTA DE SÍMBOLOS

%	Por cento
®	Marca registrada
™	<i>Trademark</i>
°C	Grau Celsius
±	Mais ou menos
×	Multiplicação
~	Aproximadamente
<	Menor que
=	Igual
-	Menos
÷	Divisão
*	Asterisco
©	Copyright

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	14
2	OBJETIVOS.....	16
2.1	OBJETIVO GERAL.....	16
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	16
3	REFERENCIAL TEÓRICO.....	17
3.1	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	17
3.1.1	Histórico.....	17
3.1.2	Caracterização.....	18
3.1.3	Virulência e fatores de patogenicidade	20
3.1.4	Resistência	22
3.1.5	Implicações clínicas	23
3.1.6	Diagnóstico	25
3.1.7	Controle e tratamento.....	27
3.2	BIOFILMES	29
3.2.1	Histórico.....	29
3.2.2	Definição.....	30
3.2.3	Aspectos gerais da adesão bacteriana e formação de biofilmes	33
3.2.4	Importância clínica e impacto econômico das infecções associadas a biofilmes.....	37
3.2.5	Microrganismos de importância clínica formadoras de biofilmes.....	39
3.2.6	Estratégias de combate ao biofilme	41
3.3	DISPOSITIVOS BIOMÉDICOS IMPLANTÁVEIS.....	44
3.3.1	Histórico.....	44
3.3.2	Biomateriais	46
3.3.3	Implantes dentários e ortopédicos.....	49
3.3.4	Titânio	50
3.3.5	Epidemiologia e impactos clínicos	52
3.3.6	Biofilme x Biomateriais.....	53
3.4	BACTERIÓFAGOS	54
3.4.1	Histórico.....	54
3.4.2	Caracterização.....	55
3.4.3	Potencial terapêutico dos bacteriófagos.....	57
3.4.4	Vantagens da fagoterapia comparativamente com à antibioticoterapia.....	59
4	MÉTODOS.....	61

4.1	AMOSTRAGEM.....	61
4.1.1	Elementos de Titânio	61
4.2	MICRORGANISMOS E CONDIÇÕES DE CULTIVO	61
4.2.1	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	61
4.2.2	Bacteriófagos	62
4.3	INDUÇÃO DE BIOFILMES <i>IN VITRO</i>	63
4.3.1	Confirmação da capacidade produtora de biofilmes das cepas clínica e ATCC® 27853™ de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	63
4.3.2	Indução de biofilme em elementos de titânio	64
4.4	CONTROLE DE BIOFILME MEDIADO POR BACTERIÓFAGOS.....	64
4.5	AVALIAÇÃO DA REDUÇÃO DE BIOFILME	65
4.5.1	Contagem de células viáveis.....	65
4.5.2	Avaliação qualitativa por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	66
4.5.3	Avaliação quantitativa por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	66
4.6	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	67
5	RESULTADOS	68
5.1	CARACTERIZAÇÃO DAS CEPAS DE <i>Pseudomonas aeruginosa</i> FRENTE AO PERFIL DE SENSIBILIDADE ANTIMICROBIANA E FORMAÇÃO DE BIOFILME	68
5.1.1	Perfil de sensibilidade antimicrobiana.....	68
5.1.2	Formação de biofilme	70
5.2	CONTROLE DE BIOFILME MEDIADO POR BACTERIÓFAGOS: TRATAMENTO	
5.2.1	Contagem de células viáveis.....	71
5.2.2	Avaliação qualitativa por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	77
5.2.3	Avaliação quantitativa por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	83
5.3	CONTROLE DE BIOFILME MEDIADO POR BACTERIÓFAGOS: PROFILAXIA	
5.3.1	Contagem de células viáveis.....	85
5.3.2	Avaliação qualitativa por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	90
5.3.3	Avaliação quantitativa da ação profilática de bacteriófagos na formação de biofilme de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).....	93
6	DISCUSSÃO.....	94
7	SUMÁRIO DE RESULTADOS	101
8	CONCLUSÃO.....	103
9	POTENCIALIDADES E LIMITAÇÕES.....	104
9.1	POTENCIALIDADES	104
9.2	LIMITAÇÕES	104
10	CONSIDERAÇÕES FINAIS	105

11 PARTICIPAÇÕES EM EVENTOS E PUBLICAÇÕES	107
REFERÊNCIAS	107
ANEXO	121
Anexo A – Certificado de qualidade titânio.	121

1 INTRODUÇÃO

Pseudomonas aeruginosa (*P. aeruginosa*) é uma bactéria ambiental oportunista onipresente, sua versatilidade, juntamente com seus fatores de virulência, a torna um patógeno altamente adaptável e desafiador de combater, principalmente devido a sua capacidade de formação de biofilme. Deste modo, o biofilme caracteriza-se por sua notável organização e funcionalidade. Essa agregação de microrganismos representa uma adaptação crucial para assegurar proteção em ambientes desafiadores, permitindo a sobrevivência bacteriana por meio de relações simbióticas (Alves et al, 2016).

Assim, com o aumento da expectativa de vida e, por consequência, da necessidade de dispositivos biomédicos para a manutenção ou restauração das funções fisiológicas, a adesão de biofilmes a estes materiais torna-se um sério problema. Esta capacidade de colonizar superfícies inertes, como próteses dentárias e ortopédicas, é um dos principais fatores de virulência dos biofilmes de *P. aeruginosa* (Pavithra; Doble, 2008).

Segundo o *National Institutes of Health*, aproximadamente 80% das infecções em todo o mundo estão associadas à produção de biofilmes, com destaque para aquelas envolvendo dispositivos biomédicos (NHI, 2002). A presença destes biofilmes representa uma ameaça a saúde pública devido ao aumento da resistência bacteriana aos antimicrobianos e ao potencial de causar infecções em pacientes vulneráveis ou portadores de implantes (Donlan, 2001). Estas infecções elevam as taxas de morbimortalidade, prolongam as internações e aumentam os custos de tratamento (Gomes et al., 2018).

Diante dessa problemática, abordagens para o tratamento e controle de biofilmes são de grande interesse para a medicina moderna. Essas abordagens podem ser divididas em duas categorias: inibição e erradicação de biofilmes já formados ou inibição da formação de novos biofilmes. Entre as estratégias de inibição, destacam-se o uso de compostos bactericidas ou bacteriostáticos para inibir o crescimento bacteriano e bloqueio da adesão bacteriana. Além disso, terapias antivirulência visam tornar os patógenos mais suscetíveis ao sistema imunológico e aos antimicrobianos, sem afetar diretamente o crescimento bacteriano (Da Silva, Giordani, Macedo, 2013).

Neste contexto, a fagoterapia, inicialmente proposta por Félix d'Hérelle em 1917, emerge como um campo de estudo promissor e uma potencial inovação tecnológica para o controle de microrganismos. Embora tenha caído em desuso com o advento dos antibióticos, a fagoterapia tem sido objeto de pesquisa recente e é reconhecida por sua vasta aplicabilidade, abrangendo áreas como agricultura, pecuária, medicina humana e industrial (Oliveira, 2021).

No entanto, o uso de bacteriófagos para o controle de biofilmes em superfícies de dispositivos médicos, como próteses dentárias e ortopédicas, representa uma alternativa promissora. Esses agentes são autolimitantes, amplamente disponíveis, diversificados e seguros para humanos, animais e plantas. Além disso não alteram as características físico-químicas dos materiais biomédicos (Abeldon, 2019).

Neste sentido, considerando a crescente prevalência de infecções associadas a dispositivos biomédicos, os desafios de tratamento, o potencial da fagoterapia e a possibilidade de aplicação em titânio. Esta dissertação buscou preencher uma lacuna importante no conhecimento científico ao investigar a aplicação de bacteriófagos na redução de biofilmes de *P. aeruginosa* em elementos de titânio. Os resultados deste estudo apontam a fagoterapia como um potencial terapêutico, contribuindo para a prevenção e tratamento eficaz de infecções associadas a dispositivos biomédicos e, conseqüentemente, a melhoria da qualidade de vida dos pacientes e segurança dos procedimentos médicos-odontológicos.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a eficácia do uso de bacteriófagos na redução e profilaxia de biofilme de *P. aeruginosa* visando aplicação em elementos de titânio.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Induzir formação de biofilme de *P. aeruginosa* aplicado em superfície de elementos compostos por titânio;
- Aplicar bacteriófagos isoladamente visando profilaxia e controle de biofilmes em superfícies de elementos compostos por titânio;
- Determinar microscopicamente a eficiência dos bacteriófagos no controle e profilaxia de biofilme em superfícies de elementos compostos por titânio.

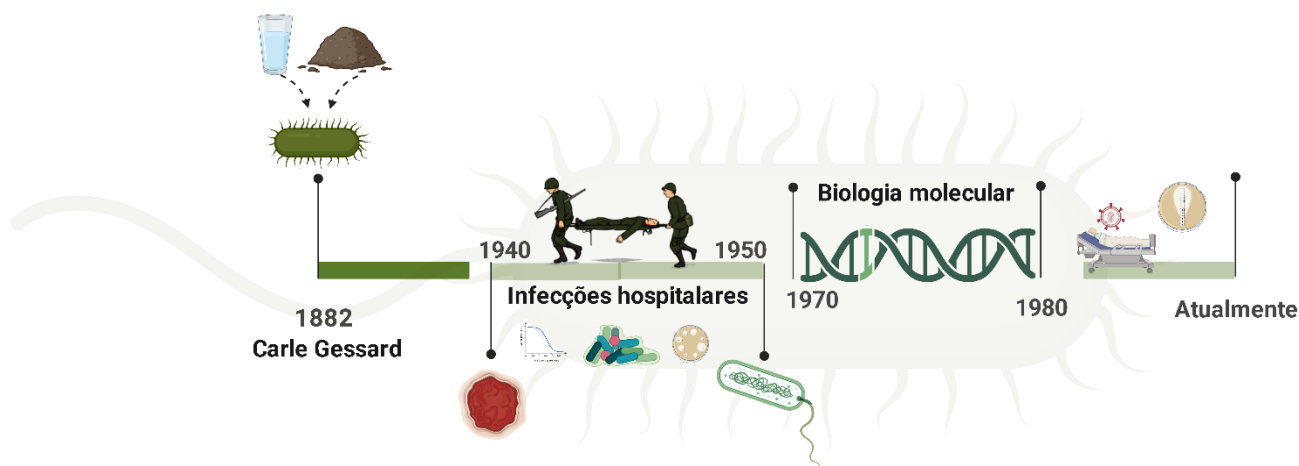
3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 *Pseudomonas aeruginosa*

3.1.1 Histórico

A história da descoberta da *P. aeruginosa*, uma notável bactéria Gram-negativa, aeróbia e não fermentadora, é uma narrativa repleta de avanços significativos na microbiologia ao longo do tempo (Figura 1). No ano de 1882, o microbiologista Carle Gessard isolou inicialmente essa bactéria de amostras de água e solo, marcando o ponto de partida para uma compreensão mais abrangente (Neves et al., 2011).

Figura 1 – História da descoberta da *Pseudomonas aeruginosa*.



Fonte: Elaborado pela autora, 2023. Usando a plataforma de edição BioRender. Disponível em: <<https://www.biorender.com/>>. Acesso em: 06 nov. 2023.

Entretanto, foi nas décadas de 1940 e 1950 que a compreensão completa da *P. aeruginosa* começou a se desenvolver, impulsionada por eventos da Segunda Guerra Mundial. Durante este período crítico, o aumento das infecções em feridas de soldados evidenciou a *P. aeruginosa* como uma causa frequente de infecções hospitalares, especialmente em pacientes com queimaduras. Este cenário desafiador levou os cientistas da época a aprofundar a caracterização da bactéria, explorando suas propriedades distintas, como padrões de crescimento, resistência a antibióticos e habilidade de formar biofilmes (Gilboa-Garber, 1982; Tuon, 2022).

À medida que as décadas progrediam, renomados pesquisadores, como Robert Koch e Paul Bergy, desempenharam papéis cruciais na expansão do conhecimento sobre a *P. aeruginosa* e suas implicações clínicas. A identificação de fatores de virulência tornou-se um

marco, juntamente com avanços na compreensão da regulação genética da bactéria. As décadas de 1970 e 1980 testemunharam um aprofundamento adicional através de avanços na biologia molecular (Reynolds; Kollef, 2021).

A capacidade desta bactéria de causar infecções graves está intrinsecamente ligada a fatores como a produção de pigmentos, toxinas, a habilidade de formar biofilmes e sua resistência a antibióticos. A pesquisa molecular, incluindo técnicas avançadas como a sequenciação genômica, continuou a enriquecer a compreensão das características genéticas e virulentas da *P. aeruginosa* (Rossi et al., 2021).

Hodiernamente, a *P. aeruginosa* permanece no foco da pesquisa científica, motivada pela sua resistência a antibióticos e a propensão para causar infecções, particularmente em indivíduos imunocomprometidos. A dedicação ao estudo constante desta bactéria é vital para o desenvolvimento contínuo de estratégias eficazes de prevenção e tratamento, destacando a importância da pesquisa para enfrentar desafios clínicos emergentes (Diggle, Whiteley, 2020).

3.1.2 Caracterização

A bactéria *P. aeruginosa* é uma espécie diversificada de bacilos Gram-negativos, aeróbia e não esporulante, amplamente disseminada e que tem a capacidade de causar infecções oportunistas em seres humanos. Esta bactéria possui uma notável adaptabilidade a diferentes condições de crescimento, graças a uma ampla gama de vias metabólicas e genes reguladores que possui em seu material genético, pode ser diferenciada por meio de diversas provas bioquímicas, formação de pigmentos, testes de sensibilidade a antibióticos e, a características como o número e a localização de flagelos. Esses fatores dentro da espécie é notável e contribui para a sua adaptabilidade a diferentes ambientes (Luján Roca, 2014).

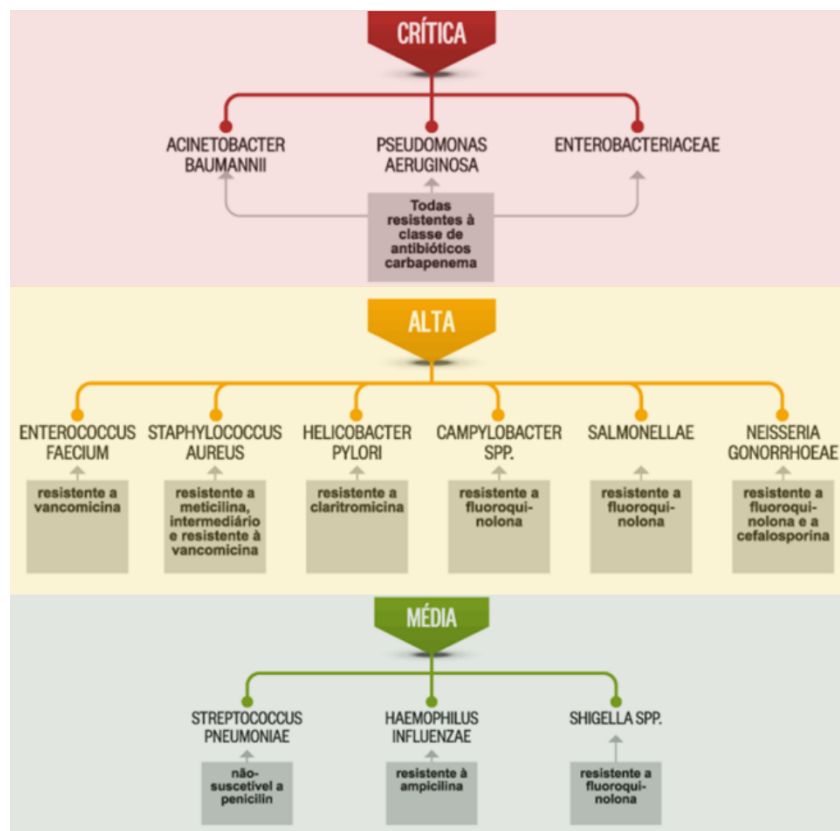
A versatilidade nutricional de *P. aeruginosa*, juntamente com seu grande número de fatores de virulência, a torna um patógeno altamente adaptável e desafiador de combater. Além disso, esta bactéria é conhecida por sua alta resistência a antibióticos, o que a torna especialmente difícil de erradicar em pacientes infectados. Isso é particularmente evidente em infecções pulmonares crônicas, como aquelas que afetam pacientes com fibrose cística, onde *P. aeruginosa* pode persistir e causar danos significativos (Bodey et al., 1983).

Assim, A presença de *P. aeruginosa* em ambiente hospitalar é uma das características mais preocupantes e desafiadoras devido à sua capacidade de disseminação clonal responsável por desencadear infecções nosocomiais e, de maneira crítica, provocar infecções letais em indivíduos imunocomprometidos, como aqueles submetidos a tratamentos contra o câncer,

intervenções cirúrgicas, queimaduras graves ou portadores do vírus da imunodeficiência humana (HIV) (Figueredo et al., 2021).

Em 2017, a Organização Mundial da Saúde a reconheceu como uma das bactérias mais ameaçadoras à vida, designando-a como patógeno prioritário para a pesquisa e desenvolvimento de novos antibióticos. A resistência desta bactéria a antibióticos é uma característica marcante, resultando em altas taxas de morbimortalidade. Estudos recentes têm se concentrado na avaliação das características genéticas de virulência, regulação gênica e resistência a antibióticos, buscando identificar abordagens futuras para o combate a essa bactéria (AGRI, 2017).

Figura 2 – Patógenos prioritários.



Fonte: Adaptado de Associação de Gastroenterologia do Estado do Rio de Janeiro (AGRI), 2017. Usando a plataforma de edição BioRender. Disponível em: <<https://www.biorender.com/>>. Acesso em: 06 nov. 2023.

A resistência intrínseca e a adaptabilidade da *P. aeruginosa* frequentemente limitam a eficácia de agentes antimicrobianos convencionais, como antibióticos, resultando em um aumento significativo da mortalidade. Além disso, a formação de biofilmes pela *P. aeruginosa* complica ainda mais o tratamento, oferecendo proteção contra as pressões ambientais, inibindo a fagocitose e conferindo capacidade de colonização e persistência a longo prazo. Esta

habilidade é impulsionada pela comunicação eficiente entre células, conhecida como detecção de *quorum*, levando à formação de biofilmes estruturados, frequentemente encontrados em infecções crônicas, como infecção pulmonar, feridas persistentes e rinosinusites (Araujo et al., 2022).

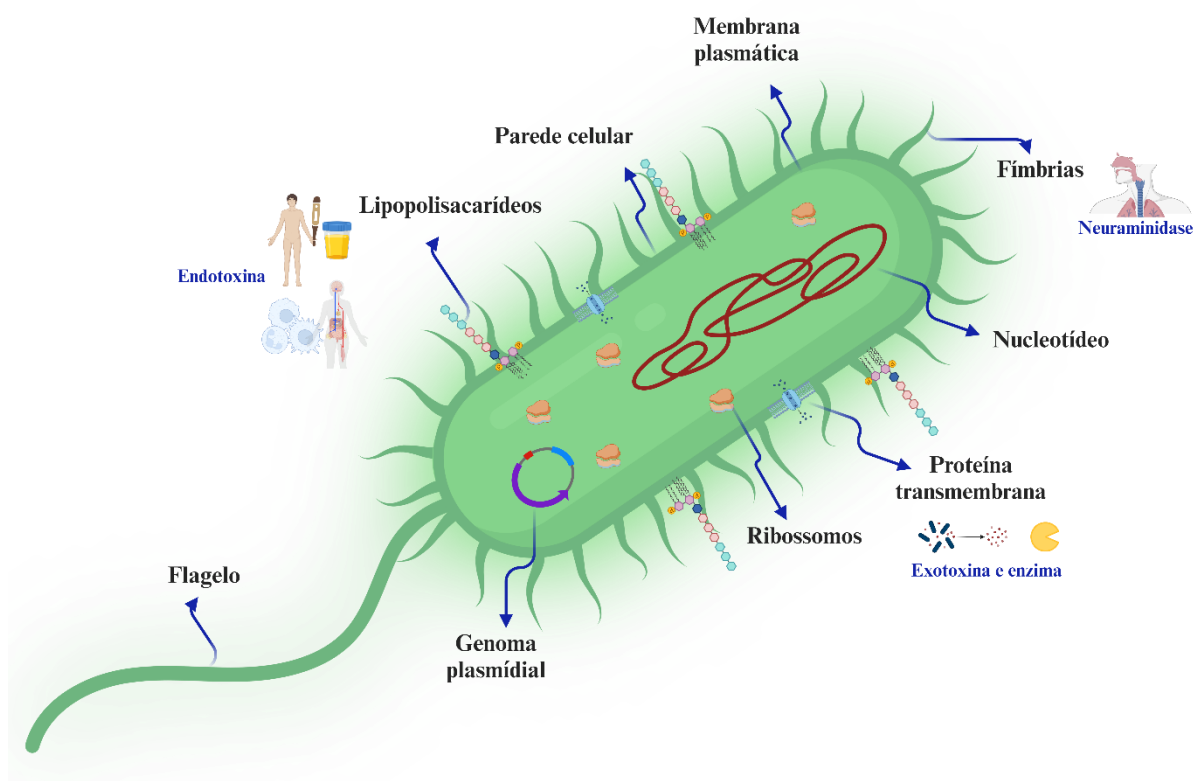
Estima-se que mais de 90% das infecções crônicas de feridas sejam influenciadas por biofilmes, resultando em cicatrização deficiente. Nos Estados Unidos, aproximadamente 6,5 milhões de pacientes são afetados anualmente, gerando uma carga significativa para o sistema de saúde, com consequências econômicas devastadoras, avaliadas em mais de US\$ 25 bilhões. Diagnosticar infecções por *P. aeruginosa* em estágios iniciais, antes da formação do biofilme, torna-se crucial para aumentar a suscetibilidade aos tratamentos antimicrobianos (Santos, 2022).

No entanto, a crescente incidência de infecções agudas e persistentes em escala global destaca a necessidade de desenvolver estratégias terapêuticas alternativas aos antibióticos tradicionais, visando desarmar e erradicar essa bactéria Gram-negativa.

3.1.3 Virulência e fatores de patogenicidade

A *P. aeruginosa*, é conhecida por sua versatilidade patogênica, apresentando uma ampla gama de fatores de virulência que contribuem para sua capacidade de causar infecções graves em hospedeiros humanos. Dentre os principais fatores de patogenicidade da *P. aeruginosa* (Figura 3), destaca-se a produção de pigmentos, incluindo piocianina e pioverdina, que não apenas conferem características visuais distintas, mas também desempenham papéis cruciais na virulência. A piocianina, por exemplo, possui propriedades pró-oxidativas e pode causar danos às células do hospedeiro, contribuindo para a patogenicidade da bactéria (Fonseca; De Marco, 2022).

Figura 3 – Virulência e fatores de patogenicidade de *Pseudomonas aeruginosa*.



Fonte: Elaborado pela autora, 2023. Usando a plataforma de edição BioRender. Disponível em: <<https://www.biorender.com/>>. Acesso em: 05 nov. 2023.

A capacidade de formar biofilmes é outra característica marcante da *P. aeruginosa*. Esta habilidade permite que a bactéria se agrupe em comunidades altamente organizadas, protegendo-se contra as defesas do hospedeiro e resistindo à ação de antibióticos. Os biofilmes formados por *P. aeruginosa* são frequentemente associados a infecções crônicas, como as que ocorrem em feridas e pulmões, representando um desafio significativo no tratamento clínico (Tuon et al., 2022). Além disso, a *P. aeruginosa* é conhecida por sua resistência a uma ampla variedade de antibióticos, o que a torna uma ameaça especialmente preocupante. Múltiplos mecanismos de resistência, incluindo a produção de B-lactamases de amplo espectro e a capacidade de formar biofilmes, contribuem para a notável habilidade da bactéria em resistir a tratamentos antimicrobianos convencionais (Lazaretti et al., 2022).

Os fatores de virulência da *P. aeruginosa* também incluem a produção de toxinas, como exotoxinas A e S, que desempenham papéis cruciais na patogenicidade, afetando a integridade das células do hospedeiro e modulando respostas imunológicas. A capacidade de adaptação rápida e a presença de sistemas de secreção eficientes também contribuem para a eficácia patogênica da *P. aeruginosa*. Portanto, a compreensão aprofundada destes fatores de

patogenicidade é crucial para o desenvolvimento de estratégias eficazes de prevenção e tratamento, especialmente considerando a crescente resistência antimicrobiana observada nessa bactéria. O estudo contínuo destes mecanismos patogênicos é fundamental para enfrentar os desafios clínicos associados à *P. aeruginosa* e melhorar as abordagens terapêuticas (Lima, 2022).

3.1.4 Resistência

A *P. aeruginosa*, apresenta intrínseca resistência a diversos antimicrobianos, constituindo um desafio significativo no tratamento de infecções associadas à esse organismo. A capacidade de desenvolver resistência durante a quimioterapia anti-pseudomonal, aliada à resistência intrínseca, compromete ainda mais a eficácia dos tratamentos (Figura 4) (Paz-Zarza et al., 2019).

Figura 4 – Possíveis causas para a resistência da *Pseudomonas aeruginosa*.



Fonte: Elaborado pela autora, 2023. Usando a plataforma de edição BioRender. Disponível em: <<https://www.biorender.com/>>. Acesso em: 05 nov. 2023.

A resistência a múltiplas classes de antimicrobianos, um fenômeno conhecido como resistência a múltiplos medicamentos (MDR), tornou-se cada vez mais comum na *P.*

aeruginosa. Relatos de isolados pan-resistentes, suscetíveis apenas à colistina como único agente terapêutico, indicam uma escalada preocupante desta resistência. Esta bactéria adquire resistência por meio de múltiplos mecanismos, incluindo mutações cromossômicas e a transferência horizontal de genes de resistência (Bolivar-Vargas; Torres-Caycedo; Sanchez-neira, 2021).

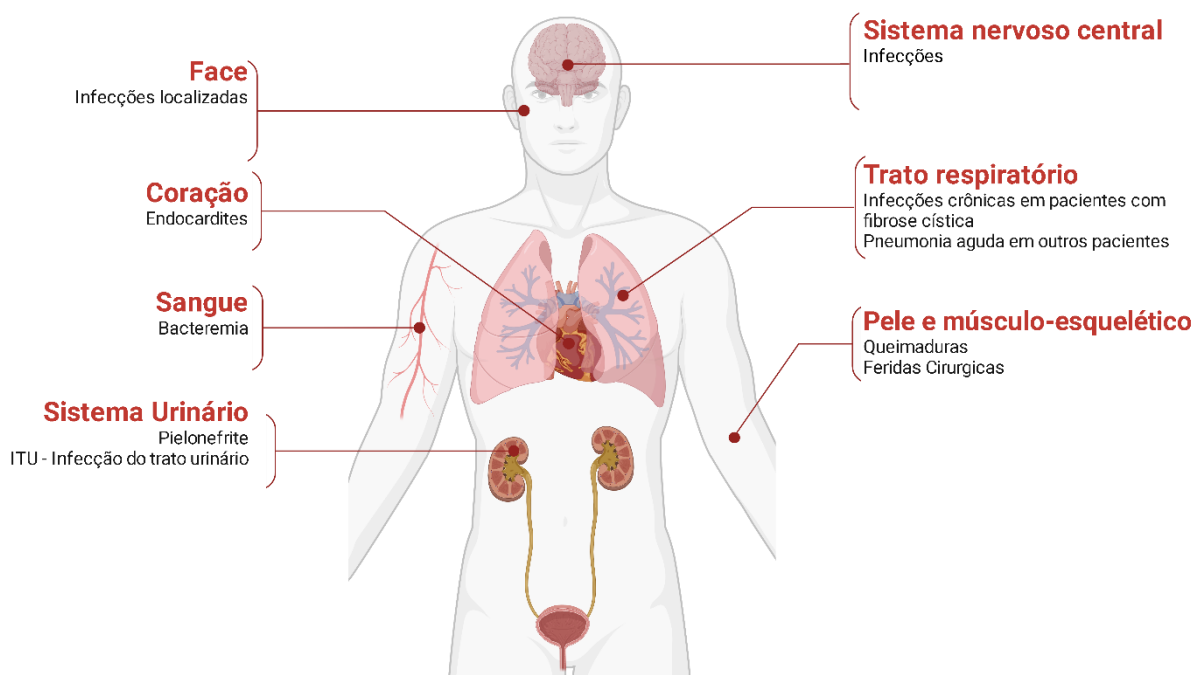
Alterações mutacionais no genoma da *P. aeruginosa* afetam a regulação de sistemas de efluxo, promovendo a expulsão de antimicrobianos, desreprimem o gene *ampC*, ampliam a especificidade da enzima AmpC (AmpC de espectro estendido), modificam a permeabilidade da membrana externa para limitar a entrada de antimicrobianos e alteram os alvos antimicrobianos. Além disso, mecanismos adquiridos incluem a produção de β -lactamases, como as β -lactamases de espectro estendido e carbapenemases, que hidrolisam uma ampla gama de β -lactâmicos, enzimas modificadoras de aminoglicosídeos e metilases de 16S rRNA, conferindo resistência a aminoglicosídeos (Silva et al., 2023).

A propensão da *P. aeruginosa* para crescer *in vivo* na forma de biofilmes, que são altamente tolerantes a antimicrobianos, e a presença de cepas hipermutadoras que geram B mutantes resistentes com maior frequência, complicam ainda mais a quimioterapia anti-pseudomonal. Diante de opções terapêuticas limitadas e do aumento contínuo da resistência, surge a indagação do possível surgimento de infecções intratável causadas por *P. aeruginosa*. Entretanto, o cenário desafiador que se delineia destaca a urgência na busca por estratégias inovadoras para enfrentar esse problema crescente na área da saúde (Vetrivel et al., 2021).

3.1.5 Implicações clínicas

A *P. aeruginosa*, apresenta uma série de implicações clínicas, especialmente em ambientes hospitalares e em pacientes com sistemas imunológicos comprometidos. Suas consequências abrangem diversas áreas (Figura 5), sendo notáveis em casos de infecções respiratórias, notadamente em pacientes com fibrose cística, bronquiectasia ou sob ventilação mecânica. Nestas situações, a infecção pode evoluir para pneumonia, caracterizada por sintomas como febre, tosse produtiva e dificuldade respiratória (Pimentel, 2019).

Figura 5 – Implicações clínicas da *Pseudomonas aeruginosa* no corpo humano.



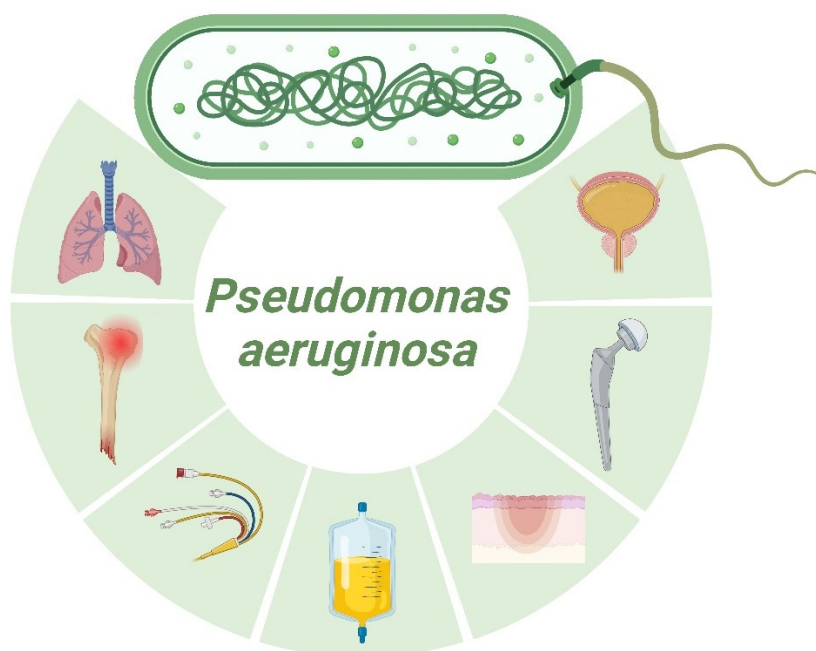
Fonte: Elaborado pela autora, 2023. Usando a plataforma de edição BioRender. Disponível em: <<https://www.biorender.com/>>. Acesso em: 05 nov. 2023.

A bactéria também pode colonizar o trato urinário, resultando em infecções do trato urinário (ITU), especialmente em pacientes com cateteres urinários. As infecções urinárias podem se tornar crônicas e desafiadoras de tratar devido à resistência da *P. aeruginosa* a vários antibióticos. Além disso, em pacientes com queimaduras, feridas cirúrgicas ou lesões cutâneas, a *P. aeruginosa* pode causar infecções locais, caracterizadas por produção de pus, odor desagradável e retardo na cicatrização (Paniagua, 2017).

Em casos mais graves, essa bactéria pode causar bacteremia, invadindo a corrente sanguínea e levando a septicemia. Isso pode resultar em choque séptico e falência de múltiplos órgãos, tornando-se uma condição potencialmente fatal. Pacientes imunocomprometidos, como aqueles em tratamento quimioterápico, transplantados ou portadores de HIV, estão mais suscetíveis a infecções por *P. aeruginosa* (Sobral, 2023).

Uma preocupação adicional é a capacidade desta bactéria de desenvolver resistência a múltiplos antibióticos, o que torna o tratamento mais desafiador e pode exigir o uso de antibióticos mais potentes, aumentando o risco de efeitos colaterais. Além disso, a *P. aeruginosa* é uma das principais causas de infecções hospitalares, muitas vezes adquiridas em ambientes de cuidados intensivos. Sua presença em dispositivos médicos, como respiradores e cateteres, pode levar a infecções oportunistas em pacientes hospitalizados (Figura 6) (Vieira et al., 2022).

Figura 6 – Locais de infecções nosocomiais mediadas por *P. aeruginosa*.



Fonte: Elaborado pela autora, 2023. Usando a plataforma de edição BioRender. Disponível em: <<https://www.biorender.com/>>. Acesso em: 05 nov. 2023.

O tratamento eficaz das infecções por *P. aeruginosa* requer uma abordagem cuidadosa, muitas vezes envolvendo a combinação de diferentes classes de antibióticos. A prevenção e o controle da disseminação dessa bactéria em ambientes de cuidados de saúde são cruciais para proteger pacientes vulneráveis e evitar complicações graves (Da Costa et al., 2022).

3.1.6 Diagnóstico

A identificação rápida e precisa das infecções por *P. aeruginosa*, especialmente em suas fases iniciais, é crucial para assegurar tratamentos eficazes e evitar a evolução para infecções crônicas debilitantes. Embora a cultura microbiológica convencional do escarro do paciente seja uma prática comum em laboratórios, novas tecnologias foram desenvolvidas para aprimorar a velocidade, precisão e especificidade dos métodos de detecção, avançando assim a gestão e vigilância das doenças (Guterres et al., 2022). Este texto abordará o progresso no desenvolvimento de testes diagnósticos, destacando suas vantagens e desvantagens.

A cultura microbiológica convencional, apesar de ser um procedimento padrão, enfrenta desafios na identificação precisa de infecções por *P. aeruginosa*. As variações morfológicas e a formação de biofilme em infecções crônicas tornam as bactérias difíceis de serem identificadas por esse método. Sistemas automatizados de identificação, como *BD Phoenix*,

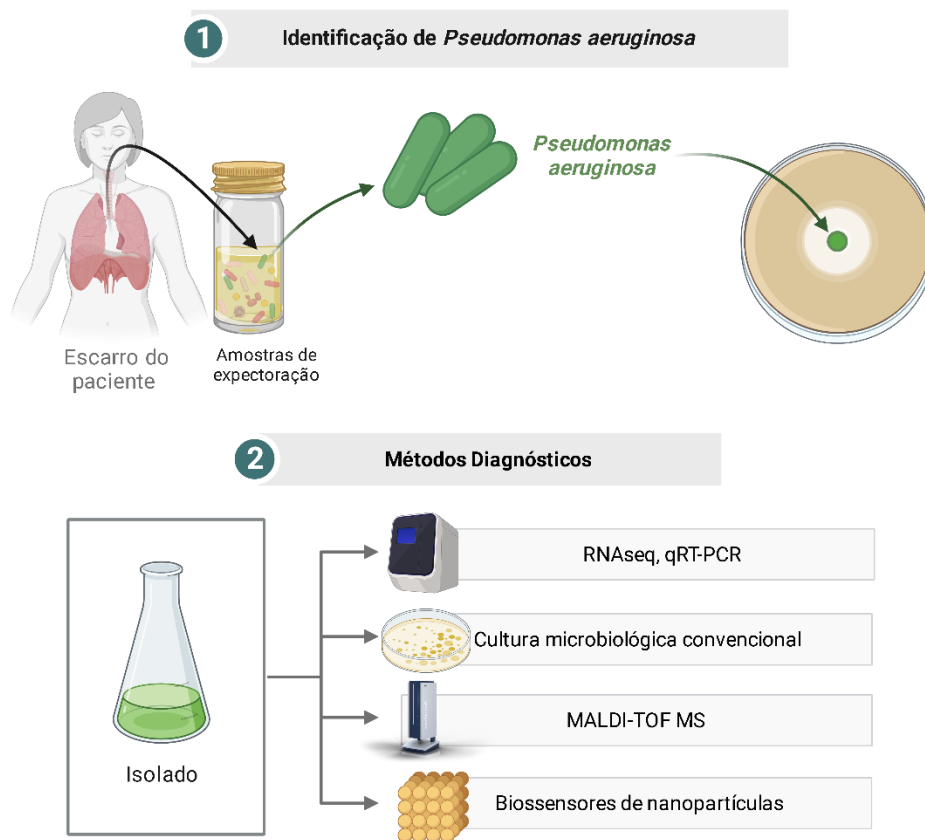
bioMérieux Vitek 2 e *MicroScan WalkAway*, são amplamente utilizados, mas sua falta de especificidade e precisão, além dos altos custos e exigências de pessoal qualificado, são limitações conhecidas (Peradotto et al., 2022).

Os métodos de biologia molecular, como a reação em cadeia da polimerase (PCR) e a PCR quantitativa em tempo real (RT qPCR), oferecem alternativas promissoras. A PCR multiplex pode abordar eficazmente resultados falso-positivos e falso-negativos, embora a alta especificidade na presença abundante de alvos genéticos seja um desafio. A reação em cadeia da polimerase destaca-se por sua rápida identificação, especialmente em condições isotérmicas, apresentando sensibilidade aprimorada (Sahade, 2019).

A espectrometria de massa MALDI-TOF MS se destaca por sua detecção rápida e confiável, gerando perfis de impressão digital de massa de peptídeos. Essa técnica não é afetada pelas condições de cultura, como meio e duração, e tem aplicações promissoras na identificação de biofilmes em estágios iniciais. Os biossensores de nanopartículas surgem como uma abordagem inovadora. Detectar moléculas específicas, como piocianina e protease LasA, esses biossensores, incluindo nanopartículas de ouro e magnéticas, demonstraram alta sensibilidade, permitindo a identificação rápida mesmo na presença de outras espécies em culturas celulares (Mulet et al., 2020).

Esses avanços em métodos diagnósticos proporcionam oportunidades significativas para aprimorar a detecção precoce de infecções por *P. aeruginosa*, oferecendo vantagens distintas e superando as limitações dos métodos convencionais. No entanto, é crucial continuar avaliando suas eficácias e limitações para garantir a implementação adequada na prática clínica (Guterres et al., 2022).

Figura 7 – Diagnóstico de *Pseudomonas aeruginosa*.



Fonte: Elaborado pela autora, 2023. Usando a plataforma de edição BioRender. Disponível em: <<https://www.biorender.com/>>. Acesso em: 05 nov. 2023.

3.1.7 Controle e tratamento

O manejo terapêutico de infecções por *P. aeruginosa* apresenta desafios singulares para o uso clínico de antimicrobianos convencionais. Esta bactéria demonstra múltiplos mecanismos de tolerância a medicamentos, classificados como intrínsecos, adquiridos e adaptativos. A formação de biofilme, um mecanismo adaptativo crucial, é considerada o principal fator de virulência, proporcionando maior sobrevivência à exposição a antibióticos e o desencadeamento de infecções crônicas (Camacho et al., 2023).

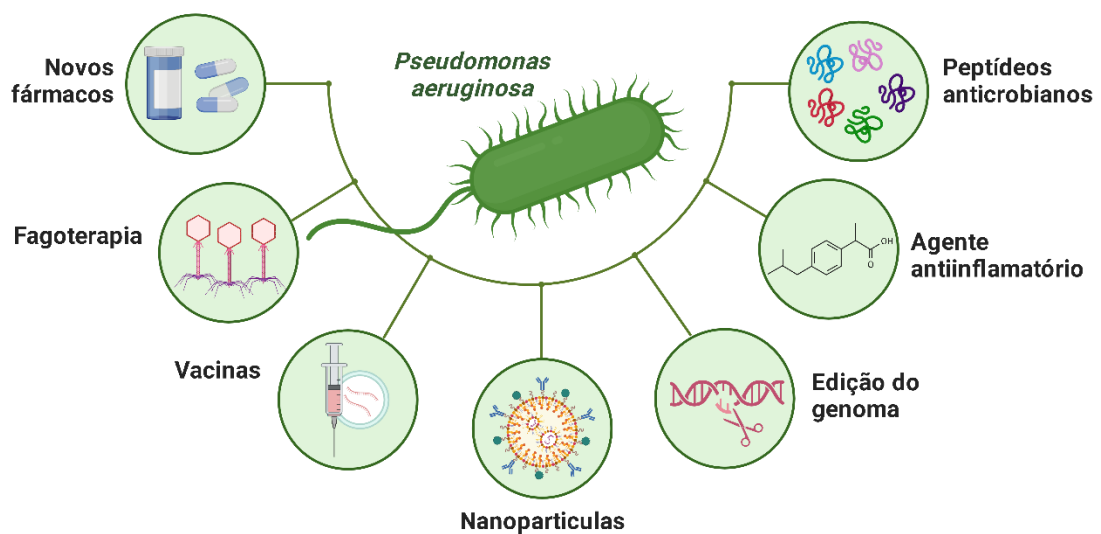
O desenvolvimento e dispersão do biofilme são regulados por um processo multifatorial, envolvendo sistemas de detecção de quórum, exopolissacarídeos e c-di-GMP. Estratégias de remediação do biofilme são essenciais para atingir diferentes constituintes da matriz do biofilme e células residentes no biofilme. A interação entre o sistema imunológico do hospedeiro e os agentes infecciosos também é crucial no tratamento de infecções relacionadas ao biofilme (Delphito, 2020).

Infecções clínicas crônicas frequentemente envolvem co-infecções de múltiplas espécies, complicando as estratégias terapêuticas. Para superar esses desafios, tem-se desenvolvido esforços direcionados a componentes do biofilme, indução de dispersão do biofilme, inibição do *quorum sensing*. Estratégias terapêuticas atuais incluem o uso de nanopartículas, enzimas que degradam a matriz do biofilme, anticorpos monoclonais biespecíficos, indução de dispersão de biofilme, inibição do *quorum sensing*, e terapia fotodinâmica e fototérmica (Emidio et al., 2020).

Nanopartículas têm sido empregadas para entregar agentes antimicrobianos aos locais de infecção, enquanto abordagens terapêuticas direcionadas a componentes e estrutura do biofilme envolvem enzimas que degradam a matriz do biofilme. Imunoterapias, como anticorpos monoclonais biespecíficos, têm mostrado eficácia potencial no controle da infecção bacteriana. A indução de dispersão de biofilme, inibição do *quorum sensing* e ações direcionadas ao metabolismo do ferro também se destacam como estratégias promissoras (Barcelos et al., 2022).

Além disso, terapias fotodinâmicas e fototérmicas têm demonstrado eficácia no combate a infecções bacterianas, incluindo aquelas relacionadas ao biofilme. Estas abordagens, juntamente com o uso de bacteriófagos conjugados a nanomateriais, representam avanços significativos no tratamento e controle de infecções por *P. aeruginosa* (Figura 8) (Vilaça et al., 2023).

Figura 8 – Novas abordagens para o combate de *Pseudomonas aeruginosa*.



Fonte: Elaborado pela autora, 2023. Usando a plataforma de edição BioRender. Disponível em: <<https://www.biorender.com/>>. Acesso em: 12 nov. 2023.

3.2 BIOFILMES

3.2.1 Histórico

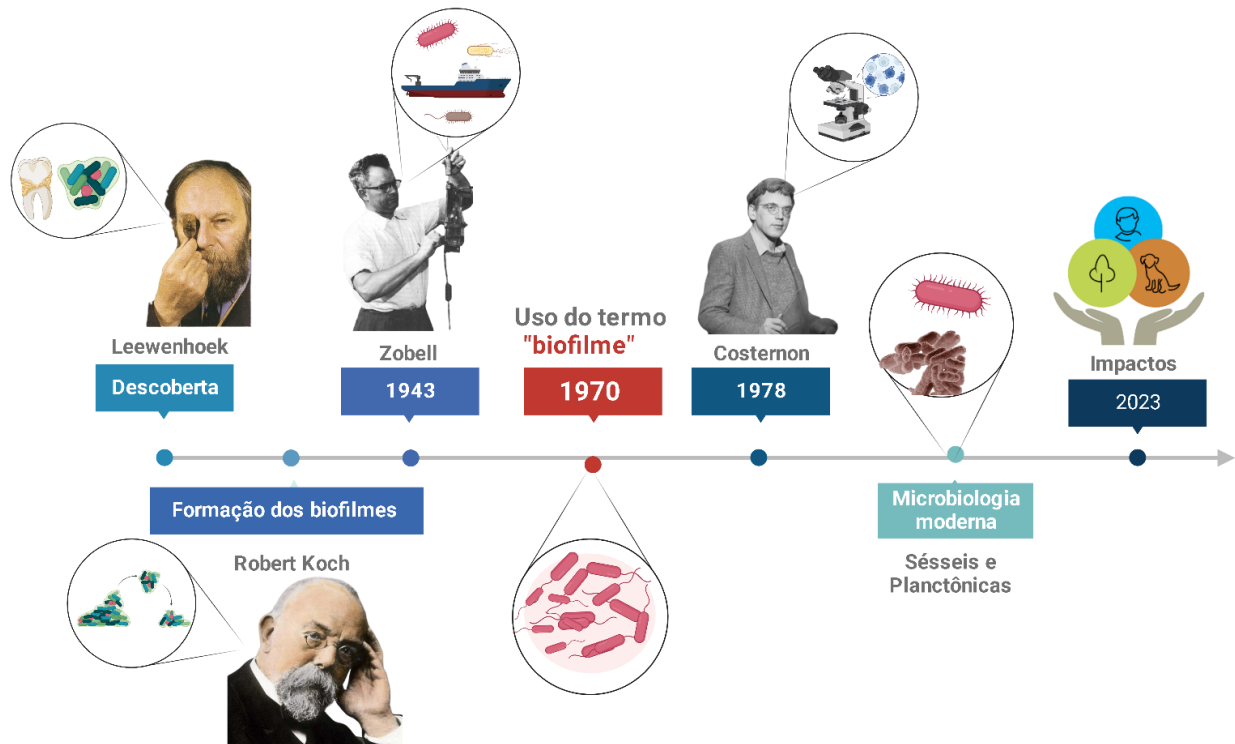
Fundamentada em observações científicas, a progressão no entendimento do conceito de biofilmes evoluiu de maneira gradual ao longo do tempo. Entretanto, cabe ressaltar que nas últimas décadas, este entendimento experimentou avanços notáveis. Durante muitos anos, a microbiologia tradicional utilizou o termo “planctônicas” para nomear as células encontradas em suspensões, acreditando ser essa a única forma de existência microbiológica. Todavia, muitas destas células planctônicas, possuem a capacidade de adesão em superfícies, formando um aglomerado celular, que em 1943, foi nomeado pela primeira vez, como biofilmes, pelo pesquisador Zobell, decorrendo a instituição desta terminologia na literatura científica, apenas em 1970 (Capeletti, 2006; Caixeta, 2008).

No entanto, os biofilmes foram estudados pela primeira vez pelo cientista holandês e construtor de microscópio, Antonie van Leeuwenhoek que, estudando amostras de dente, em seu microscópio, observou um maior aglomerado celular quando visualizado as células planctônicas. Destarte, em consonância, outros pesquisadores como o médico, patologista e bacteriologista alemão, Robert Koch, buscavam compreender a capacidade das bactérias em formar estes agregados celulares e sua adaptação em comunidades complexas (Lucchesi, 2006; Caixeta, 2008).

Porém, apesar dos biofilmes terem sido estudado muito antes do primeiro registro científico, foi por meio deste que Zobell, iniciou os estudos da adesão de bactérias marinhas em cascos de navios e em diferentes superfícies, tais como, vidro, metal e plástico. Décadas depois, em 1978, Costerton empregou metodologias mais sofisticadas e efetivas na área da microscopia, para a compreensão da ideia de que, a maioria dos microrganismos naturalmente se encontravam em comunidades, fixa a uma superfície e não em dispersão conforme se designava (Costerton; Stewart; Greenberg, 1999).

Portanto, com os avanços das observações científicas, a microbiologia moderna compreende as duas formas microbianas: planctônicas (livres) e sésseis (biofilmes). Bem como, a importância das células planctônicas como precursoras da formação dos biofilmes. No entanto, este estágio inicial torna a convivência em comunidade mais susceptível e fragilizada, haja visto que, quando encontrado em suspensão esses microrganismos são mais sensíveis as agressões ambientais. Ainda assim, esta forma microbiana foi por muito tempo, referência para a seleção de agentes antimicrobianos (Figura 9) (Rollet; Gal; Guzzo, 2009).

Figura 9 – Histórico: Estudo dos biofilmes.



Fonte: Elaborado pela autora, 2023. Usando a plataforma de edição BioRender. Disponível em: <<https://www.biorender.com/>>. Acesso em: 15 out. 2023.

Apesar disso, hodiernamente, acredita-se que 90% das bactérias são encontradas naturalmente na conformação de biofilme. A partir de então, a compreensão sobre biofilmes, tem avançado e propiciado pesquisas transdisciplinares relacionadas a ecologia microbiana e sua relação com a saúde única. Dessa forma, o estudo dos mecanismos fisiológicos e de controle para as formas microbianas existentes, tem despertado interesse e preocupação entre os pesquisadores, principalmente no que se refere aos benefícios e malefícios que essas podem ocasionar no âmbito da saúde única (Vederosa; Totsika; Fairfull-Smith, 2019; Vestby et al., 2020).

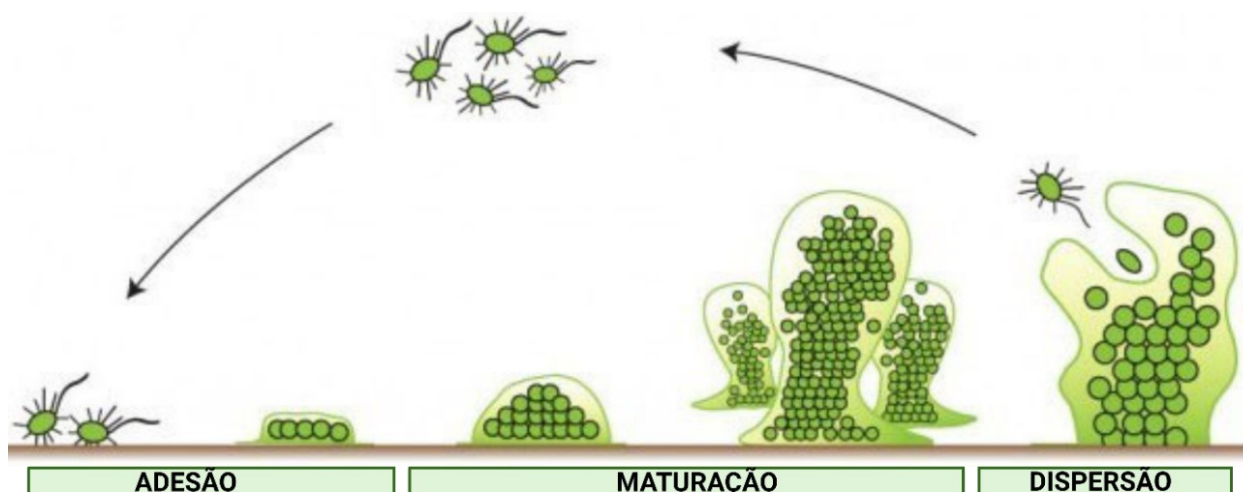
3.2.2 Definição

Há dois estados de vida existentes para as bactérias, sendo, como células planctônicas e células sésseis, ou seja, os biofilmes. Deste modo, as células livres ou planctônicas têm um importante papel para a rápida proliferação e propagação dos microrganismos, enquanto os biofilmes estão relacionados com a cronicidade. A maioria dos estudos tem demonstrado que grande parte das bactérias crescem em estruturas organizadas e funcionais como os biofilmes, sendo presente em quase todos os ecossistemas naturais e patogênicos (Neidell et al., 2012).

Logo, denominado como um modo de sobrevivência bacteriana, o biofilme corresponde a uma estrutura multifacetada de comunidades com diversas colônias bacterianas em grupo. Assim, refere-se à uma agregação tridimensional (3-D) fixada a uma superfície envolta por uma matriz de Substância Polimérica Extracelular (EPS). Dessa forma, os microrganismos não são encontrados naturalmente como culturas puras, em células individuais em suspensão, todavia, acumulam-se em agregados polimicrobianos, acreditando-se que a maioria dos biofilmes são compostos de menos de 10% de massa seca, dado que, a matriz extracelular pode corresponder aos outros 90% de sua constituição (Da Silva; Giordani; Macedo, 2017; Santana; Pimentel, 2023).

Assim, a formação e estruturação do biofilme trata-se de processo complexo, envolvendo principais mecanismos, tais como, adesão, maturação, dispersão das células bacterianas (Figura 10), ambos controlados pelo *quorum sensing*, ou seja, ferramenta de comunicação bacteriana, dependente da densidade populacional e essencial para a formação e manutenção do biofilme. Para isso, o primeiro estágio envolve a adesão reversível das células a uma superfície, dando início a formação da matriz polissacarídica e adesão irreversível. Por sua vez, o segundo estágio é caracterizado pela divisão celular e agregação das células umas às outras, formando as microcolônias, isto é, o biofilme maduro. Para assim, ocorrer a dispersão celular bacteriana, dando início a outros biofilmes. Há controvérsias na proposição dos estágios de formação do biofilme, porém, de modo geral toda propositura envolve esses principais mecanismos descritos anteriormente (Monroe, 2007; Oliveira, 2022).

Figura 10 – Processo de formação do biofilme bacteriano.

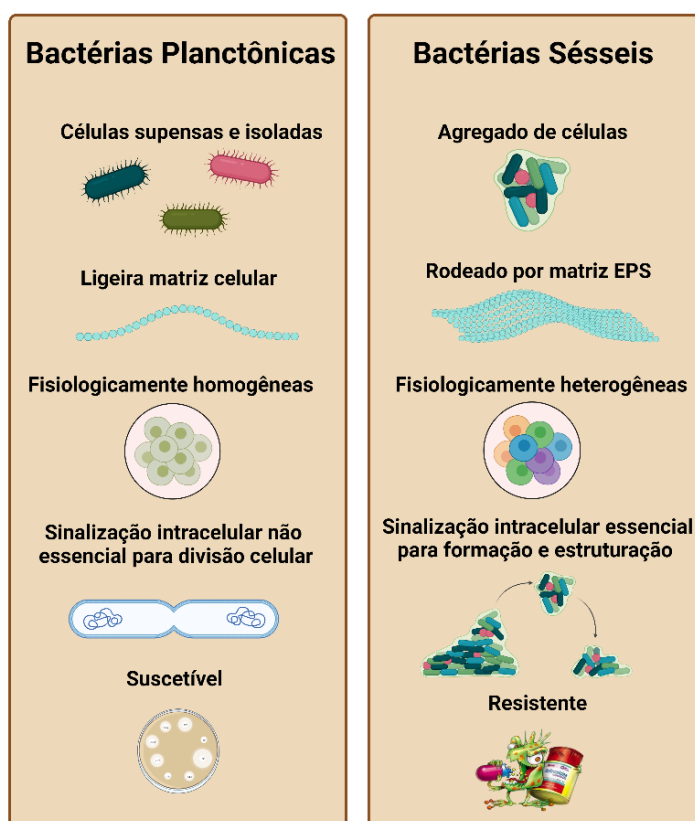


Fonte: Adaptado de Monroe (2007), elaborado pela autora usando a plataforma de edição BioRender. Disponível em: <<https://www.biorender.com/>>. Acesso em: 20 out. 2023.

Cabe ressaltar que, a estrutura de um biofilme pode ser influenciada por diversos fatores, tais como, pelas propriedades da superfície e interfaces (hidrofobicidade, rugosidade, propriedades eletroquímicas), hidrodinâmica (tensão de corte, atrito), disponibilidade de nutrientes (concentração, propriedades antimicrobianas, taxa de crescimento), diversidade ecológica (sinalização celular, motilidade) e produção de EPS, sendo a identidade de cada biofilme única e exclusiva (Gouveia, 2022).

A formação de um biofilme, propicia um estado de vida complexo e diferente do estado planctônico (Figura 11), os microrganismos dentro do biofilme podem resistir a condições hostis, sendo até mil vezes mais resistentes aos agentes antimicrobianos e conter secreção de polímeros, como polissacarídeos, DNA extracelular (e-DNA), proteínas e proteínas amiloides, ainda que, as interações precisas e moleculares dos polímeros secretados, não serem completamente compreendidas, sabe-se que estes conferem uma vasta vantagem para o modo de vida do biofilme (Monroe, 2007; Magalhães, 2011).

Figura 11 – Principais diferenças entre bactérias planctônicas e sésseis.



Fonte: Adaptado de Magalhães (2011), elaborado pela autora usando a plataforma de edição BioRender. Disponível em: <<https://www.biorender.com/>>. Acesso em: 20 out. 2023.

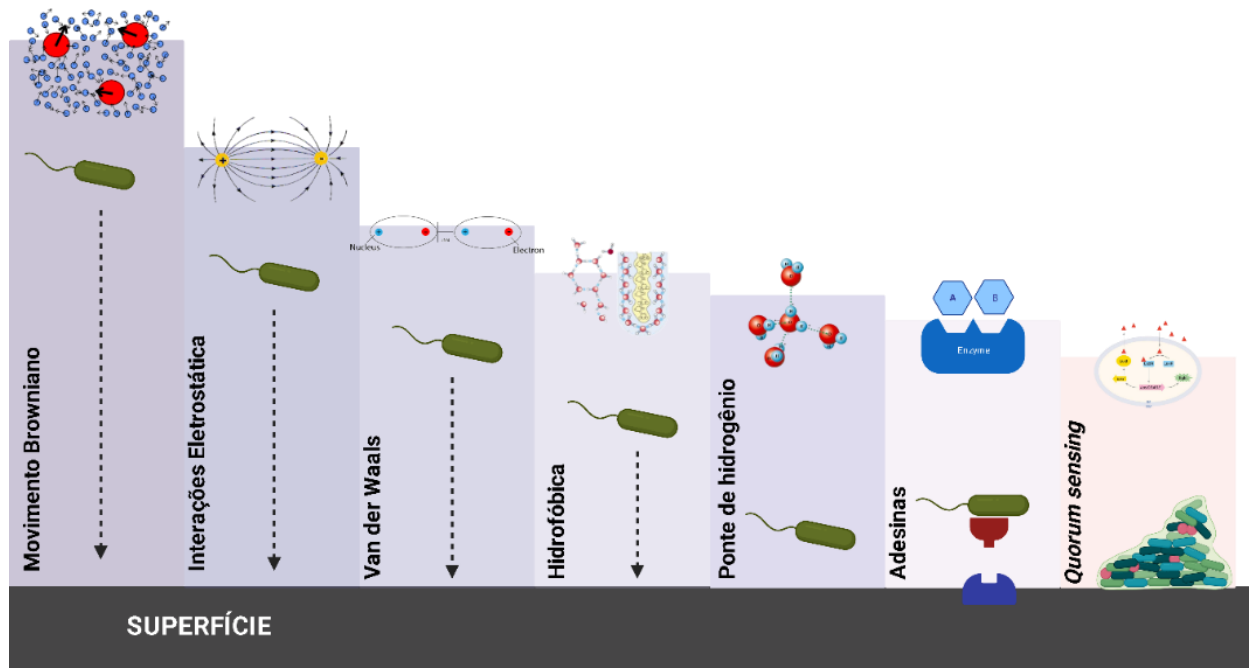
Por fim, os polissacarídeos conferem a formação da estrutura tridimensional do biofilme e são responsáveis pela adesão e coesão do aglomerado celular fixado às superfícies, ou seja, conferem resistência adicional às bactérias. De igual modo, essa estrutura oferece proteção bacteriana contra variações de pH, deficiência de nutrientes e forças mecânicas, levando a multirresistência bacteriana a antibacterianos e químicos, ou seja, a patogênese e persistência desses patógenos possui intrínseca relação com a formação e manutenção desses biofilmes intactos (Gouveia, 2022; Ré, 2022).

3.2.3 Aspectos gerais da adesão bacteriana e formação de biofilmes

A adesão bacteriana é a etapa primordial para a formação do biofilme, ocorrendo em superfícies abiótica (a-ausência, biótico-vida) inanimada como, os metais, cerâmicas e plástico ou biótica (vida) como, células, tecidos e órgãos. A adesão é dividida em duas etapas, sendo primária e secundária, ou seja, adesão reversível e irreversível, respectivamente adesão bactéria-superfície-abiótica é medida por interações físico-químicas inespecíficas, em contrapartida, a ligação bactéria-superfície-biótica ocorre por interações moleculares reguladas por interações específicas do tipo receptor-ligante (Dunne, 2002).

No que se refere, as superfícies abióticas, a afinidade entre célula planctônica-superfície acontece de forma aleatória, por meio do movimento browniano e da força gravitacional, via quimiotaxia em direção uma substância em resposta a seu gradiente de concentração ou dirigido pela motilidade através de flagelos e pili (O'toole; Kolter, 1998). O estágio primário de adesão, é orientado por interações físico-químicas não específicas de longo alcance, tais como, forças hidrodinâmicas, eletrostáticas, forças de van der Waals (Figura 12) (Dunne, 2002; Pavithra; Doble, 2008).

Figura 12 – Principais interações na adesão celular bacteriana reversível à superfície abiótica.

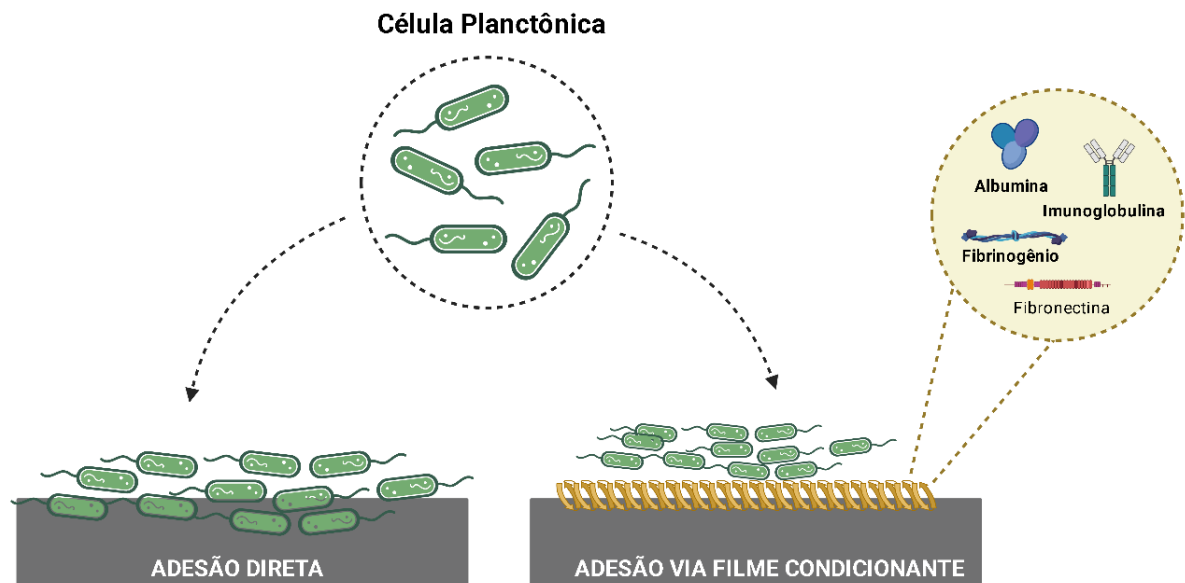


Fonte: Adaptado de Da Silva (2013), elaborado pela autora usando a plataforma de edição BioRender. Disponível em: <<https://www.biorender.com/>>. Acesso em: 17 out. 2023.

Dado que, a bactéria e superfície alcancem uma proximidade em torno de 1 nm, a adesão dependerá da soma de forças de atração e repulsão gerada entre os dois corpos (bactéria-superfície). Uma vez que grande parte das bactérias e superfícies inertes possuem cargas negativas, as interações eletrostáticas visam favorecer a repulsão nessas condições ao contrário das interações hidrofóbicas que tendem a favorecer a adesão primária. A repulsão entre os corpos pode ser superada através das adesinas e pili nas ligações específicas ou por ligações do tipo ponte de hidrogênio (Dunne, 2002; Da Silva, 2013).

Em superfícies inertes, como os dispositivos biomédicos, considerando que essa superfície será implantada em um organismo vivo, a adesão poderá ocorrer em duas formas, seja ela por adesão direta ou adesão via filme condicionante, sendo esse, um filme orgânico de composição distinta, incluindo proteínas como albumina, imunoglobulina, fibrinogênio e fibronectina (Figura 13). Uma vez que essa superfície é condicionada, sua composição é permanentemente alterada, todavia, a afinidade entre bactéria-superfície original ou condicionada é bastante diferente, contribuindo assim para o aumento da dificuldade no controle da adesão bacteriana às superfícies bióticas (O’toole; Kolter, 1998; Dunne, 2002; Da Silva, 2013).

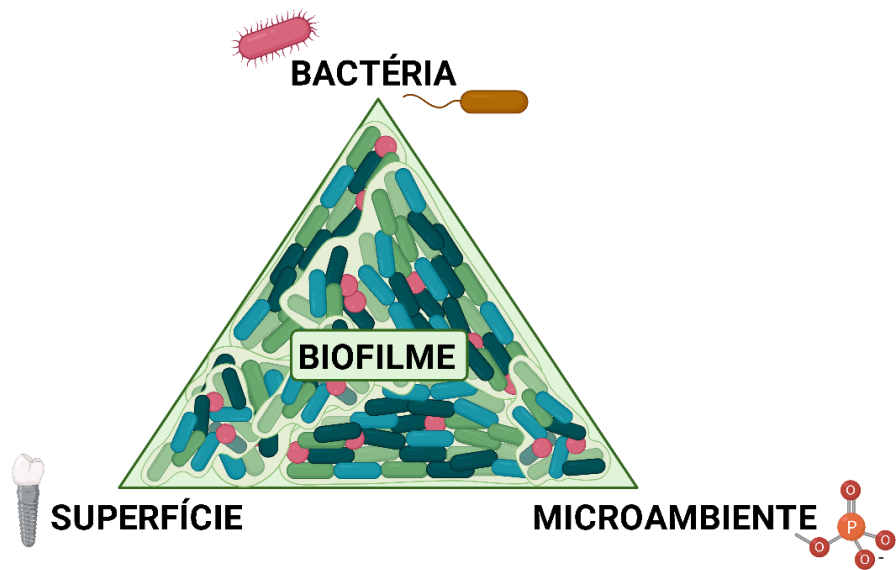
Figura 13 – Adesão bacteriana em dispositivos biomédicos.



Fonte: Adaptado de Da Silva (2013), elaborado pela autora usando a plataforma de edição BioRender. Disponível em: <<https://www.biorender.com/>>. Acesso em: 17 out. 2023.

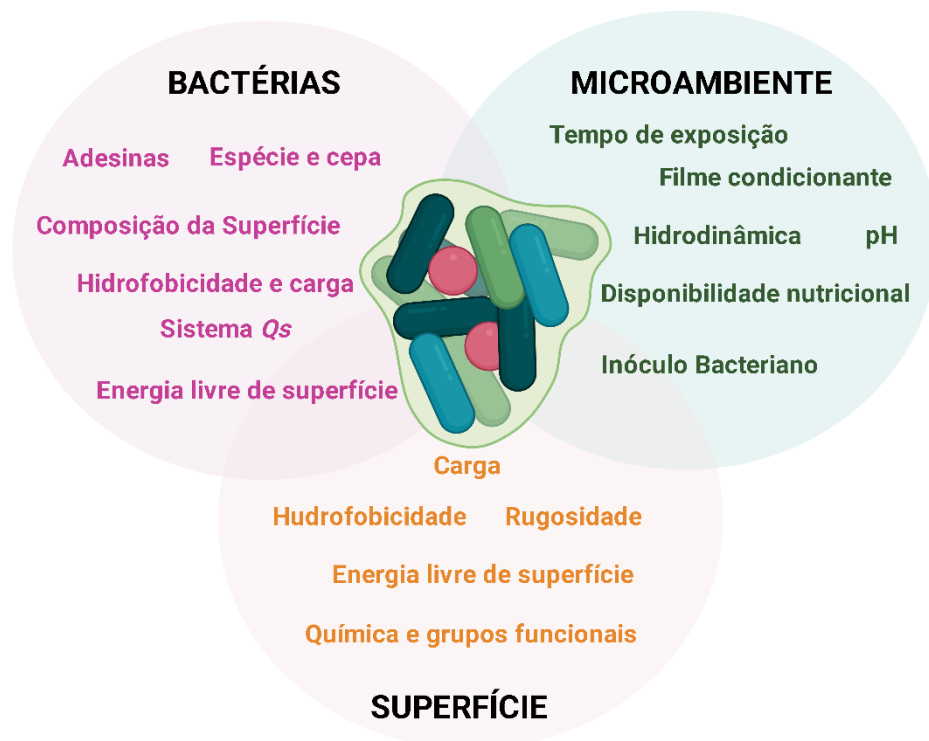
Em suma, a adesão secundária ou irreversível, efetiva a consolidação do processo através da produção da matriz polissacarídica tornando a adesão reversível, irreversível. Essa ligação pode ocorrer entre microrganismos da mesma ou de espécie diferente, dando forma ao aglomerado celular firmemente ligado a superfície. Os biofilmes maduros, possuem canaletas de água por onde é realizado a nutrição e excreção de nutrientes e metabolitos. Isto posto, sua organização trata-se de uma estrutura organizada e funcional, envolvendo interação multifacetada entre três componentes bactéria, superfície biótica ou abiótica e microambiente. Deste modo, existem diversos fatores que podem influenciar no processo de adesão bacteriana (Figura 14 e 15) (Dunne, 2002; Gouveia, 2022; Ré, 2022).

Figura 14 – Tríade da interação multifacetada da adesão bacteriana.



Fonte: Elaborado pela autora, 2023. Usando a plataforma de edição BioRender. Disponível em: <<https://www.biorender.com/>>. Acesso em: 15 out. 2023.

Figura 15 - Fatores influenciadores da adesão bacteriana.



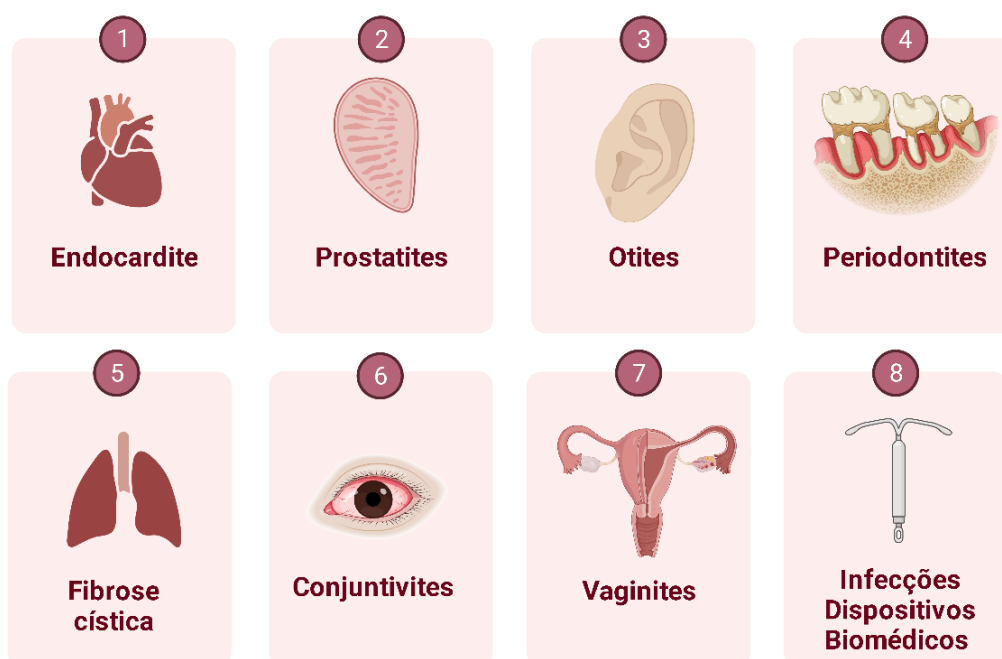
Fonte: Elaborado pela autora, 2023. Usando a plataforma de edição BioRender. Disponível em: <<https://www.biorender.com/>>. Acesso em: 15 out. 2023.

3.2.4 Importância clínica e impacto econômico das infecções associadas a biofilmes

Segundo dados do *National Institutes of Health* (NIH) no que corresponde as infecções em todo o mundo, cerca de 80% estão associados a produção de biofilmes, de modo especial as que envolvem utilização de biomateriais (NHI, 2002). A presença desses biofilmes é um sério agravo para a saúde pública, devido ao aumento da resistência dos microrganismos a agentes antimicrobianos e ao grande potencial, que estes têm de causar infecções em pacientes mais suscetíveis ou portadores de implantes ou próteses (Da Silva et al., 2013).

Assim, as infecções causadas pela formação de biofilmes bacterianos (Figura 16), trata-se de uma epidemia silenciosa, que afeta milhares de pessoas em todo o mundo, aumentando o tempo de internação e conseqüentemente os custos de tratamento desses pacientes. Dessa forma, a formação de biofilme possui um grande papel na patogênese tornando-se um grande obstáculo para a saúde humana (Costerton; Stewart; Greenberg, 1999; Donlan, 2001).

Figura 16 – Principais infecções causadas e agravadas pela formação de biofilmes bacterianos.



Fonte: Elaborado pela autora, 2023. Usando a plataforma de edição BioRender. Disponível em: <<https://www.biorender.com/>>. Acesso em: 10 out. 2023.

A resistência ao sistema imune do hospedeiro e aos agentes antimicrobianos chamam atenção para a área de estudo, visto que, bactérias em agregados celulares podem ser de 10 a

100 vezes mais resistentes que aquelas em estado planctônico. Todavia, acredita-se que ambos os mecanismos de resistência diferem entre si, em ambiente controlado esses microrganismos apresentam perfis distintos quando desafiados aos mesmos agentes, sendo sensível no formato planctônico e resistente quando na forma de biofilme (Davies, 2003).

Por conseguinte, diversos fatores têm sido apontados, para explicar a resistência microbiana relacionado ao biofilme, o primeiro fator é a matriz polissacarídica que pode atuar como barreira física, impedindo a difusão dos agentes antimicrobianos, reduzindo o tempo de exposição e quantidade exposta, bem como, interagir quimicamente com esses compostos principalmente os hidrofóbicos e, também, na limitação do transporte desses agentes pela matriz (Nichols et al., 1988).

A heterogeneidade populacional com variada atividade metabólicas propiciando um crescimento lento das células mais internas, também é vista como outro fator. A atividade metabólica consiste em quatro fases, sendo elas, alta, média, baixa atividade e células dormentes. Assim, as células dormentes ou persistes encontram-se na camada mais interna do biofilme, apresentando uma baixíssima taxa metabólica e limitação de oxigênio, fazendo com que essa camada celular seja mais persistente e conseqüentemente, resistente aos agentes antimicrobianos, tendo em vista que, a maioria dos agentes agem na fase de crescimento bacteriano, ou seja, síntese proteica, ácidos nucleicos e parede celular (Costerton; Stewart; Greenberg, 1999; Da Silva, 2013).

Contudo, com o tratamento antimicrobiana, a erradicação pode acontecer nas camadas externas com alta, média e baixa atividade metabólica, porém, a camada interna de células persistentes não é atingida e atua, como um gatilho para a reinfecção, após finalização terapêutica (Costerton; Stewart; Greenberg, 1999; Donlan, 2001; Da Silva, 2013). Conforme sua estruturação organizada, a transferência de genes de resistência, é facilitada pela troca de material genético devido à proximidade das bactérias, tornando-se outro fator crucial na resistência dos biofilmes. A transferência horizontal de genes, por intermédio de plasmídeos, pode codificar resistência para múltiplos agentes antimicrobianos (Madsen et al., 2012; Da Silva, 2013).

Outro importante fator contribuinte na resistência bacteriana, é a falha de reconhecimento dos biofilmes pelo sistema imunológico humano. Desta forma, as células no formato de biofilme tornam-se protegidas da ação dos anticorpos, radicais livres e outros compostos usados no combate de infecções. Embora, todos esses fatores supracitados possuam importantes contribuições na baixa susceptibilidade dos biofilmes aos antimicrobianos, sabe-se que de forma isolada, não conferem robustez suficiente para a ideia de que as bactérias são

sejam mais resistentes que as planctônicas, assim, afirmam-se que a resistência dos biofilmes possui causas multifatoriais (Tanaka et al, 1999).

Diante disso, a formação de biofilmes possui intrínseca associação as infecções que envolvem o uso de dispositivos biomédicos implantáveis e, conforme mencionado, sabe-se que aproximadamente 80% das infecções hospitalares estão associadas ao uso desses dispositivos (Wenzel, 2007). Segundo dados da Organização Mundial da Saúde (OMS), cerca de 11 milhões de óbitos anuais entre crianças e idosos, são ocasionados por infecções bacterianas severas. No Brasil, estima-se que 240 mil mortes anuais pela mesma causa, atualmente, é uma das principais causas de morbimortalidade tardia hospitalar, superando doenças como o infarto agudo do miocárdio e câncer. A mortalidade no Brasil chega a 65% dos casos, enquanto a média mundial está em torno de 30 a 40% (OMS, 2022).

Ainda, em panorama nacional, de acordo com, o programa *Surveillance and control of pathogens of epidemiological importance* (SCOPE), a taxa de mortalidade entre 2007 e 2010, foi de 40%, já no ano de 2022 foi de 65%, enquanto, mundialmente a média de mortalidade para infecções bacterianas é de aproximadamente 30 a 40%. Mediante o aumento da expectativa de vida humana e a estimativa da necessidade de substituição e reparo das funções fisiológicas ao longo dessa expectativa, sabe-se que maior será o número de pessoas que irão necessitar de implantes biomédicos. Isto posto, a indústria de biomateriais vem sendo uma das grandes áreas em ascensão no mundo todo, porém, vale ressaltar que, independentemente da tecnologia e sofisticação empregada na produção desses dispositivos, todos estão suscetíveis a colonização e infecção bacteriana (Holzapfel et al., 2013).

Portanto, as consequências diretas associadas aos biofilmes, consistem na dificuldade de tratamento, sendo necessário maior tempo de internação, custo com antibioticoterapia e medicações complementares, custos médicos e procedimentais. Além de danos financeiros, essa condição interfere negativamente em aspectos socioeconômicos e na qualidade de vida dos pacientes. Atualmente, estima-se que o custo para tratamento de infecções associadas aos DMI e biofilmes, custam de 5 a 7 vezes mais do que o valor inicial para inserção do mesmo. Logo, esse procedimento impacta diretamente no aumento das taxas de morbimortalidade (Da Silva, 2013).

3.2.5 Microrganismos de importância clínica formadoras de biofilmes

Os biofilmes são de grande importância clínica, devido a sua relação com as infecções crônicas, principalmente em pacientes imunossuprimidos e ou, portadores de dispositivos biomédicos implantáveis. Todavia, essas infecções por muitas vezes estão associadas a

consórcios microbianos multiespécies, porém, também podem ocorrer de forma unitária. Algumas das espécies possuem papel primordial na virulência e na estrutura organizacional nos biofilmes, favorecendo dessa forma, a sobrevivência e proteção das demais espécies envolvidas, assim, de fato, participam ativamente da infecção (Burmolle et al., 2010).

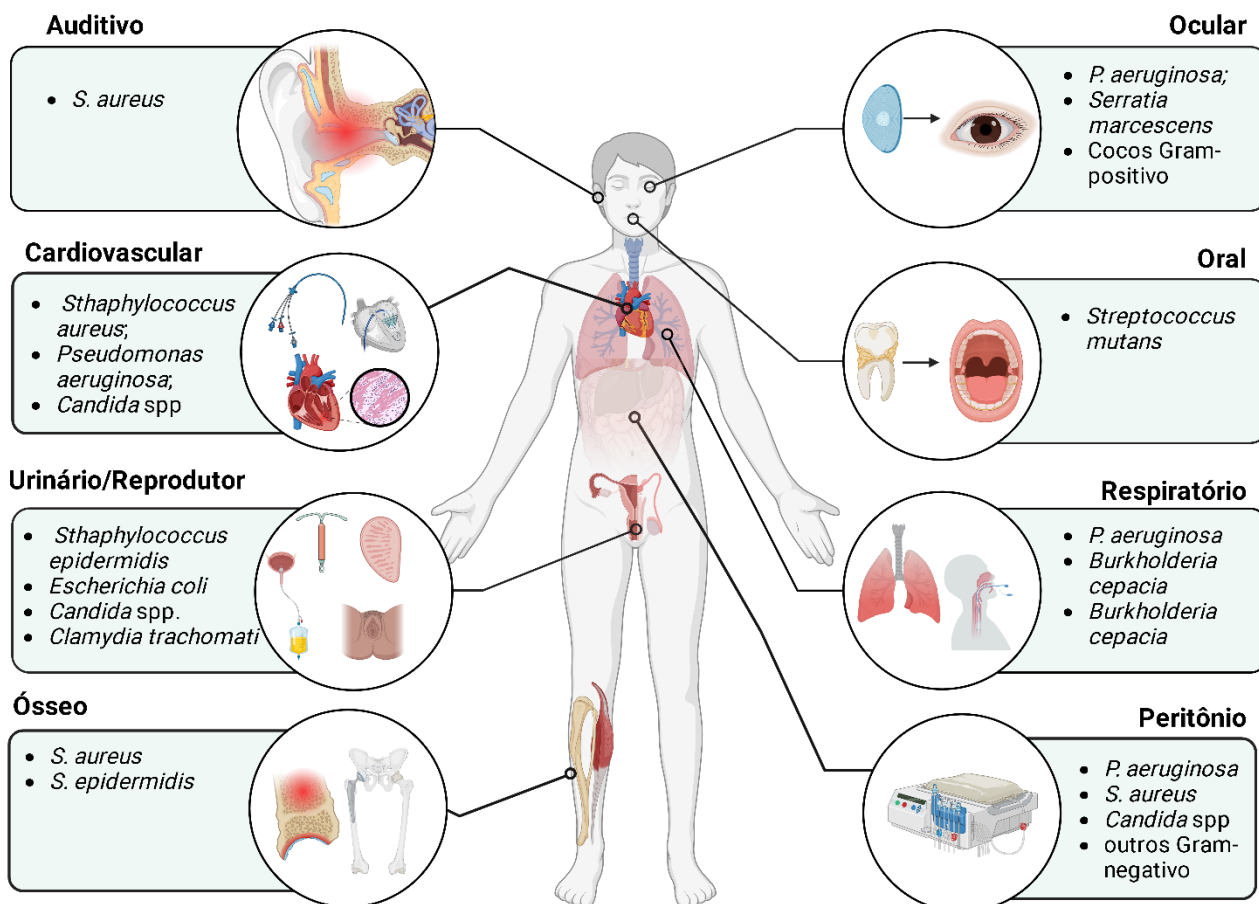
Ao contrário do que se imagina, os consórcios microbianos não são responsáveis apenas pelos malefícios na saúde humana, também possuem papel importante e benéfico para o organismo, sem causar danos ou sintomatologia. O microbioma humano, ou seja, o conjunto de microrganismos que habitam as várias partes do corpo como pele, cabelo, cavidade oral, vias aéreas, trato gastrointestinal e trato urogenital de um indivíduo, desempenha um papel fundamental no desenvolvimento e regulação do sistema imunológico, quando saudável, pode auxiliar e prevenir doenças autoimunes, alergias e inflamações crônicas (Alhede et al., 2020).

Apesar de, naturalmente não causarem doenças diretamente, quando em disbiose ocasionada por diversos fatores, tais como infecções virais, o ambiente imunossuprimido ou defasado pode propiciar, um ambiente ideal para o desenvolvimento de patógenos oportunistas desencadeando uma mudança fenotípica, que provoca a dispersão de bactérias virulentas do biofilme. Essa mudança, contribui efetivamente para a contaminação de ambientes limpos do corpo humano, como pulmão, cérebro e coração desenvolvendo doenças como pneumonias, meningites e endocardites (Arias; Brito, 2021).

Assim, os principais patógenos formadores de biofilmes encontrados em infecções humanas incluem gêneros gram-negativos e positivos, sendo os organismos gram-positivos associados a maioria das infecções do sistema locomotor, o gênero *Staphylococcus* spp. é o de maior importância nessa condição. Já os microrganismos gram-negativos despertam maior atenção, uma vez que são mais resistentes aos agentes microbianos, a exemplo da *P. aeruginosa*, microrganismo que pode ser destacada com um patógeno de extrema importância desse grupo (Alvelino et al., 2010).

Contudo, a compreensão da relação fenótipo-patogênese ainda é pouco descrita, mas recentemente alguns estudos contribuíram de forma significativa para a tentativa de compreensão desse mecanismo. Contudo, sabe-se que 80% das doenças bacterianas possuem o biofilme como estágio primário da patogênese, causando assim, diversas condições clínicas, a figura 17, demonstra alguns dos principais patógenos oportunistas encontrados nessas condições (Ardita et al., 2014; Beitelshes et al., 2018).

Figura 17 – Microrganismos de importância clínica formadores de biofilme.



Fonte: Adaptado de Da Silva (2013), elaborado pela autora usando a plataforma de edição BioRender. Disponível em: <<https://www.biorender.com/>>. Acesso em: 31 out. 2023.

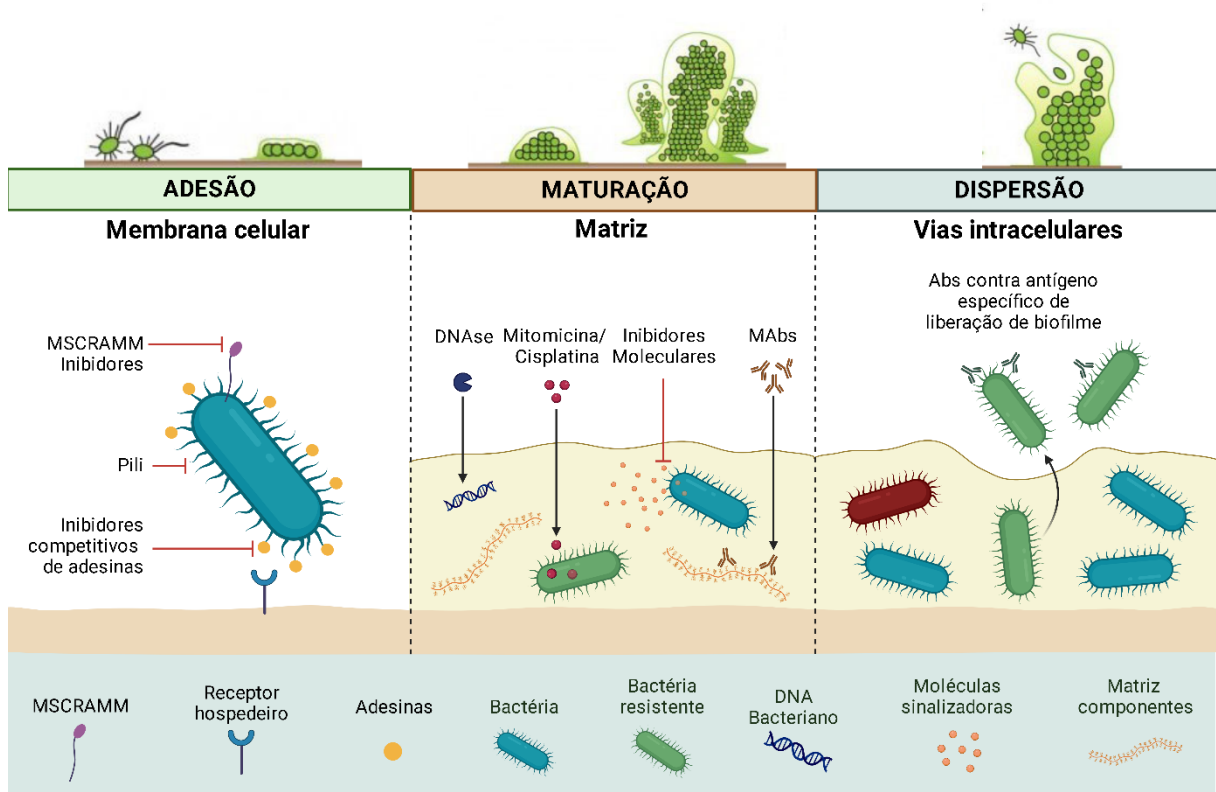
3.2.6 Estratégias de combate ao biofilme

O controle e tratamento de biofilmes bacterianos envolve uma abordagem multidisciplinar e facetada. As estratégias para seu combate, são divididas em dois principais segmentos: inibição da formação de biofilmes através do bloqueio da adesão celular bacteriana a superfície e rompimento da comunicação celular bacteriana, como também, a erradicação ou tratamento de biofilmes já formados por meio da modificação de superfícies, ou seja, recobrimento com compostos bioativos (Dunne, 2002).

Porém, com base na heterogeneidade da formação do biofilme sua inconsistência no estado metabólico e fenótipos impacta em alvos terapêuticos de grande dificuldade para o desenvolvimento de tratamentos antimicrobianos. A figura 18, destaca as características de cada fase que representam alvos terapêuticos ou oferecem oportunidades para estratégias anti-biofilme, que em suma maioria são possuem resultados insatisfatórios nos tratamentos, mesmo diante da compreensão desses principais alvos já estarem bem robustamente elucidados na

literatura, elucidando a importância do desenvolvimento de novas estratégias ou combinações das já existentes, para o combate dos biofilmes em novos mecanismos de ação em diferentes alvos (Beitelshees et al., 2018).

Figura 18 – Alvos terapêuticos anti-biofilme por fase de formação.



Fonte: Adaptado de Beitelshees et al., 2018. Adaptado da plataforma de edição BioRender. pela autora, 2023. Disponível em: <<https://www.biorender.com/>>. Acesso em: 31 out. 2023.

No que tange, as fases de formação do biofilme e as estratégias de controle, a prevenção do desenvolvimento do biofilme é de suma importância. Dessa forma, a inibição do biofilme por meio do bloqueio da adesão bacteriana a uma superfície, principalmente em dispositivos biomédicos ou por intermédio do comprometimento do *Quorum sensing* (QS) tem sido vista como uma estratégia promissora e tem recebido bastante atenção (Lynch; Robertson, 2008).

Apesar do uso da profilaxia bacteriana ser controversa, por seu curto efeito e podendo contribuir para o desenvolvimento da resistência bacteriana, principalmente em ambientes e organismos imunossuprimidos ou defasados. Os revestimentos, imersões e terapias de bloqueio com agentes antimicrobianos para as superfícies abióticas, tem proporcionado a diminuição da incidência de contaminações e infecções por microrganismos nessas superfícies e em seus portadores. Terapias combinadas ou recobrimento desses dispositivos podem propiciar ação em

diferentes alvos para melhora da efetividade do tratamento, a exemplo terapias com bacteriófagos, vírus que infectam especificamente bactérias, podem tornar o patógeno mais suscetível ao sistema imunológico e aos antimicrobianos comumente utilizados (Beitelshees et al., 2018).

Ao considerar superfícies bióticas, como órgãos e tecidos, a prospecção de novos fármacos por meio de estratégias biotecnológicas tem se demonstrado eficiente para impedir a adesão bacteriana. Por outro lado, visando o controle em ambas as superfícies, as adesinas são os principais alvos de estudos, uma vez que, comprometendo a capacidade de adesão desses microrganismos não haverá o desenvolvimento de biofilmes, os potenciais fármacos anti-adesão terão uma vasta gama de aplicabilidades (Lazar, 2011).

O uso de compostos inibidores do sistema de comunicação célula-célula, os quais competem com o mesmo receptor das enzimas de *Quorum Quenching*, podem degradar as moléculas de sinalização impedindo a comunicação bacteriana. Esse impedimento da comunicação bacteriana na fase de maturação do biofilme, faz com que, não ocorra a finalização do biofilme irreversível, pela ausência da produção de EPS (Romero; Acuna; Otero, 2012). Curiosamente, alguns estudos têm demonstrado microrganismos como a *P. aeruginosa*, ainda possuem capacidade de formação de biofilme mesmo com a modulação do sistema QS, demonstrando assim, a complexidade dos mecanismos envolvidos na formação dos biofilmes (Schaber et al., 2007).

A erradicação do biofilme já formado também é vista como uma estratégia de controle importante. Basicamente essa técnica ocorre por meio da utilização de fármacos antimicrobianos e no caso dos dispositivos biomédicos, sua substituição, todavia, os custos são excessivamente altos tanto ao paciente quanto aos sistemas de saúde. O biofilme não é por si só um mecanismo irreversível, os microrganismos ali presentes são capazes de realizarem a dissociação do mesmo em casos de privação nutricional ou em condições ambientais desfavoráveis, para isso, eles convertem seu comportamento e tornam-se células planctônicas novamente (Macedo; Abraham, 2009; Otto, 2013).

Esse comportamento de dissociação pode ser visto como mecanismo importante para a busca de estratégias de erradicação do biofilme, bem como, o uso de enzimas que podem impactar em outros mecanismos, tal como na ruptura da membrana polissacarídica, tornando o patógeno mais sensível aumentando a eficiência de terapia coadjuvante. Contudo, os compostos bioativos também têm sido vistos como potenciais ferramentas para o combate de biofilmes, entretanto, a obtenção “*in vivo*” da efetividade “*in vitro*” tem sido o maior desafio para as estratégias de combate anti-biofilme (Oliveira, 2021; Murray et al., 2022).

3.3 DISPOSITIVOS BIOMÉDICOS IMPLANTÁVEIS

3.3.1 Histórico

A perda de um órgão ou de uma parte do corpo, além de gerar uma perda da função fisiológica, pode gerar transtornos sociais e psicológicos. Mediante ao aumento da expectativa de vida, os esforços para os avanços na medicina e odontologia moderna têm proporcionado o desenvolvimento de técnicas que possibilitem uma melhor qualidade de vida. O desenvolvimento e viabilidade dessas técnicas tem ofertado aos pacientes opções como substituição parcial ou total de diversas funções fisiológicas comprometidas por implantes biomédicos (Silva, 2012).

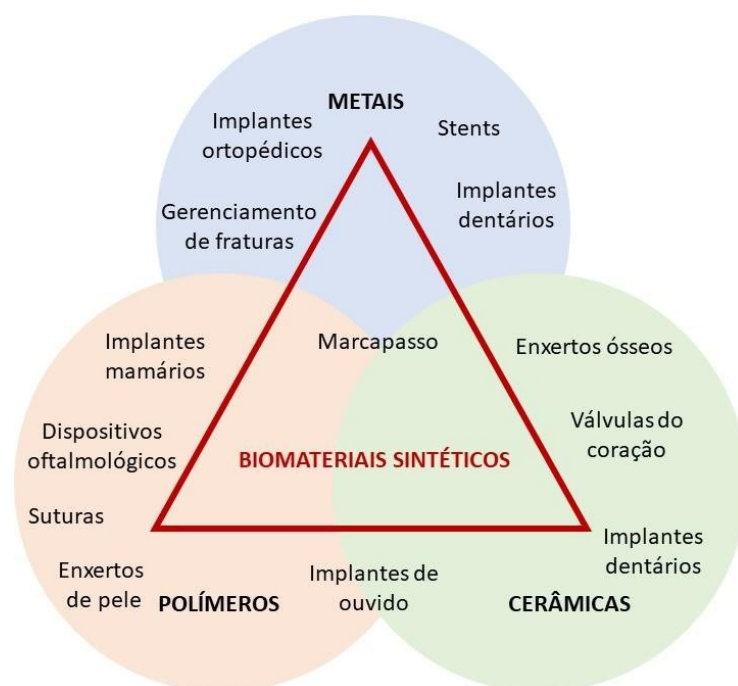
Contudo, a necessidade de inovação tecnológica para a substituição de partes danificadas ou destruídas do corpo humano, conduziram os cientistas das mais diferentes áreas na investigação de novas técnicas e aprimoramento das já existentes. Todavia, os implantes biomédicos denominados como qualquer dispositivo elaborado com a finalidade de reestabelecer uma função, dentro do organismo vivo, possuem uma longa história, segundo registros, as primeiras pesquisas de desenvolvimento do mesmo, ocorreram por volta de 1950, tornando-se viável o conceito de dispositivo implantável. Esses esforços realizados na década de 50, resultaram na primeira implantação de um marca-passo cardíaco em ser humano, no ano de 1958, apesar de sua duração ter sido por apenas três horas, constitui-se de um marco tecnológico para a medicina (Santos, 2019).

A partir disso, ocorreram diversos e importantes desenvolvimentos teórico-práticos a fim de melhorar a viabilidade de implantes, contudo, o termo implante corresponde a uma ampla variedade de dispositivos capazes de atuar na identificação, diagnóstico, tratamento e reabilitação de um processo patológico, podendo ser utilizados simultaneamente em mais de uma função. Atualmente, a categoria de implantes biomédicos mais conhecida pela população, são aquelas que englobam o processo de reabilitação de funções fisiológicas do organismo, sendo as próteses dentárias e ortopédicas inclusas nessa categoria (Neves, 2019).

Mediante sua vasta aplicabilidade, os dispositivos médicos implantáveis ou biomateriais encontra-se habitualmente em contato com os tecidos vivos ou fluidos corporais, resultando em uma complexa relação entre substâncias vivas e não-vivas. Isto posto, esses dispositivos requerem a utilização de materiais que apresentem características específicas que visam viabilizar sua aplicação (Figura 19), entretanto, as mais importantes são as características químicas, físicas, mecânicas e biológicas, que correspondem a composição, as ligações e

estruturas atômicas do material; estado físico, densidade e as diferentes porosidades; resistência e dureza dos materiais e ao comportamento biológico do material, respectivamente (Schmalz; Galler, 2017).

Figura 19 – Aplicabilidade dos dispositivos biomédicos implantáveis.



Fonte: Lemons et al., 1996.

Os principais biomateriais utilizados na fabricação desses dispositivos, podem ser organizados em quatro categorias, sendo essas, os polímeros, metais, cerâmicas e compósitos (silicone e polimetilmetacrilato). Os metais possuem grande importância para as aplicações na área da odontologia e ortopedia, sendo os mais utilizados: titânio, os aços inoxidáveis e as ligas metálicas. Em geral, esses materiais são utilizados no fabrico de diferentes dispositivos médicos, com múltiplas aplicações (Lemons et al., 1996).

As informações aqui presentes, permitem o desenvolvimento da percepção acerca dos benefícios que os dispositivos biomédicos implantáveis vêm proporcionando em termos longevidade e qualidade de vida para as pessoas. Entretanto, espera-se ainda mais contribuições dessa técnica, à medida do avanço de novas pesquisas na medicina moderna. Contudo, a infecção é uma das principais limitações para que seja mantido a permanência desses dispositivos no organismo, apesar de ser considerada de baixo incidência, o aumento do número de pessoas submetidas ao uso de transplantes tem aumentado a ocorrência dessas infecções,

que podem gerar consequências devastadoras para os pacientes implantados (Neidell et al., 2012).

O implante, atua no organismo como um “corpo estranho” o que ocasiona a modificação do microambiente local, dessa forma, favorece a contaminação bacteriana, por via direta ou hematogênica, facilitando a invasão, e colonização da superfície do biomaterial. A infecção periprotética, torna-se resistente a ação de antimicrobianos, sendo necessário, na maioria das vezes a remoção completa do dispositivo para a efetivação do tratamento e “cura”. Os custos com a infecção associadas aos biomateriais são relativamente elevados e por muitas vezes, chegam a custar três vezes mais que o procedimento inicial, entretanto, o mecanismo completo dessa interação ainda não é esclarecido (Friedman, 1998; Queiroga, 2013).

3.3.2 Biomateriais

Os biomateriais representam uma parcela significativa dos produtos empregados no campo da saúde, estimando-se em cerca de 300 mil há aproximadamente uma década. Dentro dessa categoria, podemos mencionar dispositivos biomédicos, como biossensores, tubos para circulação sanguínea e sistemas de hemodiálise, além de materiais implantáveis, como suturas, placas, substitutos ósseos, tendões, telas ou malhas, válvulas cardíacas, lentes, dentes, dispositivos para liberação de medicamentos (como filmes, implantes subdérmicos e partículas), órgãos artificiais, incluindo coração, rim, fígado, pâncreas, pulmões e pele, e curativos, entre outros (Moretti; Uziel; Rozenal, 2017).

O conceito de biomaterial considera-se biomateriais como dispositivos que interagem com sistemas biológicos, incluindo fluidos biológicos, e que têm aplicações diagnósticas, vacinais, cirúrgicas ou terapêuticas. Esses materiais podem ser compostos por substâncias de origem sintética ou natural, assim como por materiais naturais quimicamente modificados, apresentando-se tanto na forma sólida quanto em gel, pasta ou mesmo líquido. Vale ressaltar que não necessariamente precisam ser fabricados, incluindo exemplos como válvulas cardíacas de origem suína e retalhos de pele humana tratados para serem utilizados como implantes (Camilo; Maset. Rollo, 2012).

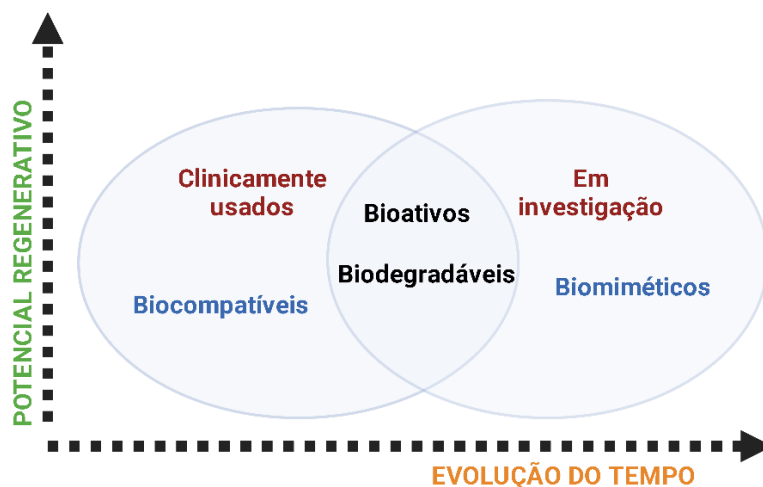
A utilização de biomateriais possui uma longa história, remontando à antiguidade, e sua aplicação na resolução de diversos problemas relacionados à saúde humana é evidente desde tempos remotos. Exemplos incluem o uso de suturas feitas de linho e ouro no Antigo Egito (2000 a.C.), de intestino de gatos na Europa durante a Idade Média, e de dentes artificiais confeccionados a partir de conchas pelos maias (600 a.C.), de ferro pelos franceses (200 a.C.) e de ouro e madeira pelos romanos, chineses e astecas. No mesmo contexto, substitutos ósseos

feitos de madeira foram identificados no Antigo Egito e na Europa, na Idade Média, demonstrando eficaz osseointegração (Pires, 2015).

Inicialmente, até o século passado, a abordagem predominante no desenvolvimento e aplicação de biomateriais era predominantemente empírica, baseada em tentativa e erro. Entretanto, nos estudos recentes nessa área, tem-se observado uma transição para abordagens mais sistemáticas. No início da utilização mais organizada de biomateriais, por volta da década de 1950, a busca estava voltada para materiais bioinertes, com foco no próprio material. Com o tempo, a ênfase passou para a bioatividade dos biomateriais, evoluindo posteriormente para o objetivo de regenerar efetivamente um tecido funcional, com uma atenção específica ao aspecto biológico (Carvalho et al., 2010).

Contudo, o primeiro objetivo era obter materiais biocompatíveis capazes de substituir tecidos danificados e fornecer suporte mecânico, minimizando a resposta biológica do paciente. Ao longo do tempo, a atenção voltou-se para prolongar a vida útil do implante por meio da interação com a interface do tecido hospedeiro; em seguida, houve uma busca por materiais biodegradáveis, capazes de serem incorporados ou absorvidos pelo tecido hospedeiro (após dissolução). Mais recentemente, o foco tem sido o conceito de biomimética, visando materiais que desempenhem um papel ativo no processo de recuperação, agindo de maneira específica no tecido com estimulação a nível celular. Essa evolução no desenvolvimento e utilização de biomateriais é ilustrada na Figura 20, que também indica que os materiais clinicamente mais utilizados na atualidade são predominantemente das categorias biocompatíveis, bioativos e biodegradáveis, enquanto os mais pesquisados são os bioativos, biodegradáveis e biomiméticos (Rodrigues, 2013; Pires, Bierhalz; Moraes, 2018).

Figura 20 - Evolução no desenvolvimento e utilização de biomateriais.



Fonte: Adaptado de Pires; Bierhalz; Moraes.,2018. Adaptado da plataforma de edição BioRender. pela autora, 2023. Disponível em: <<https://www.biorender.com/>>. Acesso em: 31 out. 2023.

O processo de desenvolvimento de biomateriais inicia-se com a identificação da necessidade para uma aplicação específica, como tratamento de doenças, substituição de órgãos ou uso cosmético. Em seguida, ocorre o projeto e síntese dos materiais, seguido por testes abrangentes. Os biomateriais selecionados passam por fabricação, esterilização e embalagem, seguidos por testes mais detalhados. Aspectos regulatórios, estudos clínicos, triagem e acompanhamento de longo prazo são enfocados após a pré-aprovação no mercado (Bernardo et al., 2021).

O desenvolvimento é uma abordagem multidisciplinar, envolvendo profissionais de diversas áreas, como químicos, farmacêuticos, engenheiros, físicos, biólogos, médicos e dentistas. As propriedades dos biomateriais variam conforme a aplicação, mas características biológicas, físicas, mecânicas e químicas são comumente avaliadas. As propriedades biológicas incluem biocompatibilidade, hemocompatibilidade, citotoxicidade, alergenicidade e estímulo à adesão celular (Da Silva et al., 2021).

As propriedades físicas abrangem morfologia, energia superficial, encaixe anatômico, rugosidade, porosidade, cor, transparência e permeabilidade. As propriedades mecânicas envolvem tensão de ruptura, alongamento e flexibilidade, enquanto as químicas incluem densidade, estabilidade, resistência à esterilização e degradação. Biomateriais implantáveis são classificados em quatro categorias com base nas reações celulares: tóxicos, não tóxicos ou inertes, não tóxicos e bioativos, e não tóxicos e degradáveis. Essas classificações dependem da interação com as células circundantes e podem impactar na formação de tecido ao redor do

implante ou na capacidade de as células crescerem e substituírem a matriz do biomaterial (Spezzia, 2020).

O mercado de biomateriais é significativo em termos de unidades comercializadas e movimentação financeira, podendo ser dividido com base em dois critérios: o tipo de composto (metais, cerâmicas, polímeros, materiais naturais) e a aplicação (ortopédica, cardiovascular, odontológica, oftalmológica, cirurgia plástica, engenharia tecidual, tratamento de lesões, distúrbios neurológicos, sistemas gastrointestinais e urinários, liberação de drogas e cirurgia bariátrica) (Sulzer; Borges; Silva, 2022).

O uso anual de diferentes tipos de biomateriais varia, por exemplo, com cerca de 1 bilhão de catéteres, 150 milhões de lentes de contato e 7 milhões de lentes intraoculares. O mercado global de biomateriais expandiu-se notavelmente, movimentando US\$ 25,6 bilhões em 2008 e atingindo US\$ 44 bilhões em 2012, com previsões de alcançar US\$ 88,4 bilhões em 2017, mantendo uma taxa de crescimento anual de 22,1%. Os implantes ortopédicos são líderes em vendas, estimando-se alcançar US\$ 57,9 bilhões em 2016. Biomateriais cardiovasculares representam 34,5% do mercado. O mercado brasileiro atingiu US\$ 690 milhões em 2010, aproximadamente US\$ 1,7 bilhões em 2015, impulsionados principalmente pelos setores ortopédico e cardiovascular (Pires, Bierhalz; Moraes, 2018; Sulzer; Borges; Silva, 2022).

O crescimento do mercado é atribuído ao envelhecimento da população, aumento do poder aquisitivo em países em desenvolvimento e melhorias tecnológicas no tratamento de doenças anteriormente consideradas não tratáveis. O envelhecimento populacional, prevendo-se que 21,1% da população terá mais de 60 anos em 2050, impulsionará a demanda por biomateriais e terapias regenerativas. O mercado de engenharia tecidual, visando aplicações em medicina regenerativa, espera avanços significativos, especialmente na área de *scaffolds* para suporte ao crescimento celular (Miranda; Hartman, 2022).

Empresas globais, como Invibio Ltd., Kyocera Corporation, Bayer, e muitas outras, desempenham papéis essenciais na produção de biomateriais. O investimento futuro em biomateriais é impulsionado por iniciativas como workshops da *National Science Foundation* dos EUA, que identificam desafios, oportunidades e orientações para pesquisas na área. A análise detalhada das categorias de compostos químicos, suas propriedades e aplicabilidades é crucial para o desenvolvimento contínuo nesse campo (Pires; Bierhalz; Moraes, 2018).

3.3.3 Implantes dentários e ortopédicos

Os implantes dentários e ortopédicos, que representam avanços significativos na evolução da medicina, revolucionaram a maneira como profissionais de saúde abordam a

restauração de funções e a melhoria da qualidade de vida dos pacientes. A pesquisa contínua e a inovação nesses campos visam aprimorar ainda mais essas tecnologias. Avanços recentes incluem técnicas menos invasivas, procedimentos mais personalizados e materiais mais avançados, proporcionando não apenas soluções eficazes, mas também reduzindo os tempos de recuperação e melhorando a qualidade de vida pós-tratamento (Bacchi; Mueller, 2020).

No campo dos implantes dentários, a inovação é evidente, com a utilização generalizada de materiais biocompatíveis, como o titânio, na fabricação de pequenos parafusos que simulam raízes artificiais. Esses implantes, inseridos no osso maxilar ou mandibular, proporcionam uma base sólida para a fixação de coroas dentárias. A osseointegração, um processo crucial em que o osso natural se funde ao implante, desempenha um papel fundamental na estabilidade e no sucesso a longo prazo do procedimento. Além da substituição de dentes perdidos, os implantes dentários contribuem significativamente para a restauração da mastigação eficaz e a reabilitação estética do sorriso (Barros, 2020).

No cenário dos implantes ortopédicos, a variedade de aplicações é ampla, abrangendo desde a fixação de fraturas com placas e parafusos até a substituição de articulações comprometidas por próteses. Esses implantes desempenham um papel fundamental na correção de deformidades, no reparo de lesões e no tratamento de doenças degenerativas. Materiais como titânio, aço inoxidável e ligas de cobalto-cromo oferecem a durabilidade e resistência necessárias para suportar as demandas biomecânicas do corpo (Oliveira et al., 2023).

É crucial destacar que, além dos aspectos técnicos, a abordagem multidisciplinar envolvendo cirurgiões, dentistas, ortopedistas e outros profissionais de saúde desempenha um papel crucial no sucesso desses procedimentos. A colaboração entre essas especialidades resulta em tratamentos mais abrangentes e individualizados, adaptados às necessidades específicas de cada paciente. No entanto, é importante considerar os desafios clínicos associados, como a formação de biofilmes e a possibilidade de infecções, exigindo constante vigilância e inovação para otimizar a eficácia desses procedimentos (Lima, 2023).

3.3.4 Titânio

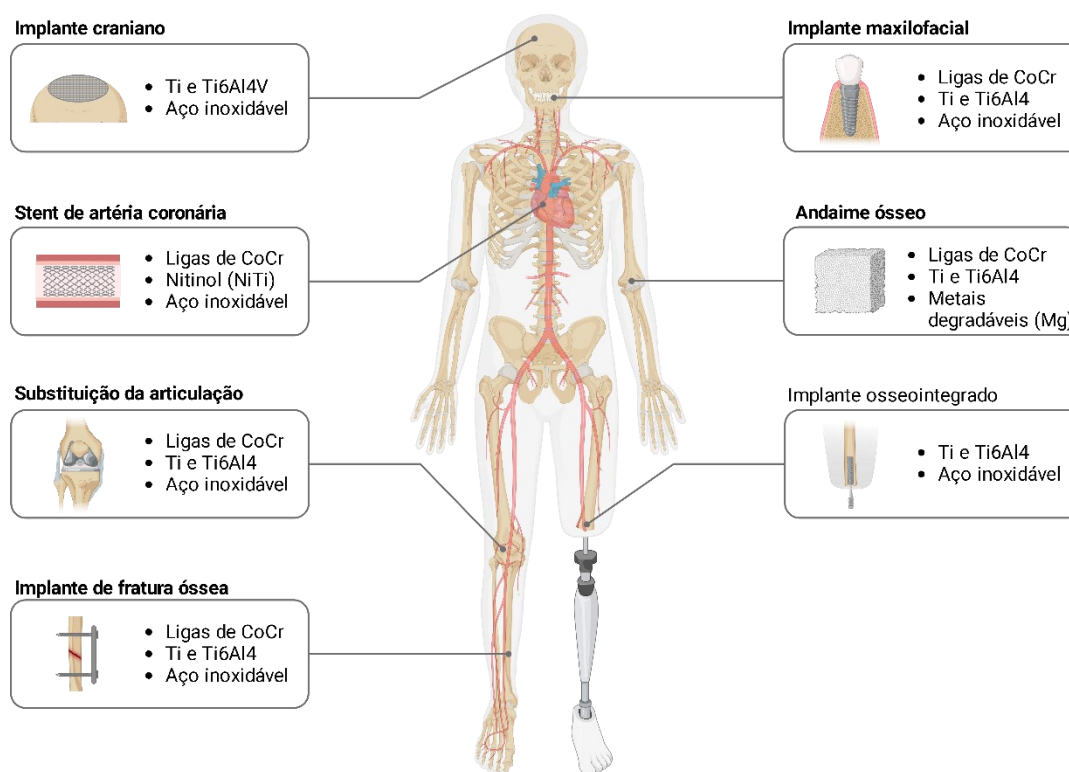
Dentre da vasta gama de biomateriais, esse tópico busca dar ênfase ao uso do titânio e suas características visando aplicações biomédicas. Assim, considerado um metal de grande importância estratégica, o titânio foi descoberto em 1791, por William Gregor, seu nome é originário da palavra grega *titanes*, que na mitologia grega corresponde a um dos filhos de urano (céu) e gaia (terra). O titânio é um dos dez elementos mais abundante na natureza, ocupando a nona posição, sendo encontrado na forma de combinações químicas, em sua maior parte com

oxigênio e ferro, apesar de sua característica resistente, a ocorrência de impurezas não-metálicas, como hidrogênio, carbono, nitrogênio ou oxigênio, o torna quebradiços, mesmo quando essas contaminações ocorrem em pequenas quantidades (Baltar, 2008).

O titânio é comumente utilizado em diversas aplicações industriais, desde a fabricação de turbinas para aviões supersônicos até próteses ortopédicas e dentárias. Sua utilização para diversos fins, deve-se as suas propriedades excepcionais, tais como: resistência, alto ponto de fusão, densidade elevada, alta resistência a corrosão, grande resistência mecânica, estabilidade térmica e principalmente sua elevada biocompatibilidade (Peyrot, 2016). Assim, o titânio tem sido extremamente usado na indústria biomédica em geral, são usados em implantes ortodônticos, próteses corpóreas, instrumentos cirúrgicos e alguns dispositivos especiais (Bilessimo, 2012).

O titânio e suas ligas possuem vasta aplicabilidade na área médica, devido a sua equivalência ao osso humano em algumas propriedades mecânicas (Figura 21). Porém, existem certas características que precisam ser avaliadas, como alguns indícios de problemas relacionados as suas propriedades mecânicas, como porosidade que facilita a adesão bacteriana e formação de biofilmes, como também, a composição química de suas ligas, a exemplo o alumínio pertencente a determinadas ligas suspeitas associadas a comorbidades como o mal de Alzheimer (Espinoza, 2010; Benčina et al.,2021).

Figura 21 – Aplicações do titânio.



Fonte: Adaptado de Benčina et al.,2021. Adaptado da plataforma de edição BioRender. pela autora, 2023. Disponível em: <<https://www.biorender.com/>>. Acesso em: 31 out. 2023.

3.3.5 Epidemiologia e impactos clínicos

Desde próteses ortopédicas até *shunts* ventriculares, os procedimentos médicos contemporâneos estão cada vez mais dependentes de dispositivos internos, muitos dos quais permanecem no corpo por períodos prolongados. Infelizmente, as infecções relacionadas a esses dispositivos continuam a ser um desafio significativo na prática clínica (Alves, 2019).

Dos 2.6 milhões de implantes ortopédicos inseridos anualmente nos Estados Unidos, cerca de 112,000 (4.3%) resultam em infecção. A taxa anual de infecção para implantes cardiovasculares é ainda mais elevada, atingindo 7.4%. Considerando todos os dispositivos internos, o número total de infecções associadas a dispositivos médicos implantados se aproxima de 1 milhão por ano (Hetrick et al., 2006).

Além disso, é preocupante observar que a administração sistêmica de antibióticos tem mostrado eficácia limitada contra esse tipo de infecção. Como resultado, a remoção do implante e, ou amputação tornaram-se opções cada vez mais comuns. Além do impacto humano em

termos de dor e sofrimento, essas infecções representam um significativo ônus econômico para a sociedade, com estimativas de custos médicos diretos superando os 3 bilhões anualmente apenas nos Estados Unidos (Hetrick et al., 2006).

A maioria dos implantes é realizada em pacientes com 65 anos ou mais, mas com o aumento da expectativa de vida global e avanços na tecnologia médica, espera-se uma crescente demanda por implantes médicos, resultando, conseqüentemente, em um aumento proporcional das infecções associadas a esses dispositivos (Hetrick et al., 2006).

Dado que as infecções frequentemente têm origem na flora normal da pele e membranas mucosas do paciente, composta por bactérias Gram positivas e Gram negativas, o que pode resultar na contaminação do dispositivo durante a inserção cirúrgica, um dos desafios diagnósticos diários é distinguir entre as estirpes clinicamente relevantes e as contaminantes (Poelstra, 2002; Katsikogianni et al., 2004; Ziebuhr et al., 2006).

A acumulação de bactérias na superfície de dispositivos específicos, como cateteres, pode levar ao bloqueio mecânico e à degradação do material (Withener et al., 1993). Em alguns casos, *estafilococos* coagulase negativos podem metabolizar componentes de cateteres plásticos na ausência de outros nutrientes, utilizando-os para sustentar seu crescimento na superfície do biomaterial (Pascual, 2002).

Dada a diversidade e o número de implantes utilizados, juntamente com a complexidade no tratamento de infecções associadas a esses dispositivos, torna-se essencial realizar estudos abrangentes sobre os processos que levam à colonização das superfícies, bem como desenvolver novas estratégias de prevenção.

3.3.6 Biofilme em biomateriais

Os biofilmes em biomateriais representam uma área de intensa investigação e preocupação na ciência biomédica. Um biofilme é uma comunidade microbiana complexa que se forma quando bactérias, fungos e outros microrganismos aderem a uma superfície e secretam uma matriz extracelular polissacarídica que os protege e facilita a comunicação intercelular. Quando esse fenômeno ocorre em biomateriais, como próteses, *stents*, cateteres e implantes, pode resultar em conseqüências significativas para a saúde humana (Cometta et al., 2022).

A formação de biofilmes em biomateriais é uma preocupação clínica importante devido à sua associação com infecções persistentes e de difícil tratamento. Esses biofilmes podem abrigar patógenos resistentes a antibióticos, dificultando a erradicação completa da infecção. Além disso, a presença de biofilmes em biomateriais pode comprometer a eficácia desses

dispositivos, levando à necessidade de remoção ou substituição, o que pode causar desconforto para os pacientes e aumentar os custos do tratamento médico (Stewart; Bjjarnsholt, 2020).

A complexidade dos biofilmes em biomateriais reside na sua capacidade de se adaptar e resistir às abordagens tradicionais de tratamento. As bactérias dentro do biofilme podem exibir resistência aos antibióticos, tornando-se mais difíceis de serem combatidas. Além disso, a matriz extracelular que compõe o biofilme atua como uma barreira física, impedindo a penetração eficaz de agentes antimicrobianos (Cieplik et al., 2022).

Os métodos de prevenção e controle de biofilmes em biomateriais têm se tornado uma área crítica de pesquisa. Estratégias inovadoras incluem o desenvolvimento de biomateriais com propriedades antimicrobianas incorporadas, revestimentos que inibem a adesão bacteriana e terapias que visam interromper a formação do biofilme. O entendimento mais profundo da biologia dos biofilmes e das interações entre os microrganismos e os biomateriais é fundamental para o desenvolvimento bem-sucedido dessas estratégias. Em suma, a presença de biofilmes em biomateriais representa um desafio significativo na área biomédica, exigindo abordagens inovadoras para prevenção, diagnóstico e tratamento. A pesquisa contínua nesse campo é crucial para melhorar a eficácia dos biomateriais e garantir a segurança e durabilidade dos dispositivos implantáveis na prática clínica (Rodrigues et al., 2021; Cieplik et al., 2022).

3.4 BACTERIÓFAGOS

3.4.1 Histórico

A fagoterapia, uma forma de terapia bacteriana que utiliza fagos (ou bacteriófagos), é uma abordagem antiga, mas que ganhou renovado interesse e pesquisa nas últimas décadas. Os fagos são vírus que atacam especificamente bactérias, sendo naturalmente encontrados em ambientes onde as bactérias proliferam, como solos e corpos d'água (Dos Santos, 2020).

O conceito de fagoterapia remonta ao início do século XX, quando o microbiologista francês Felix d'Herelle, juntamente com o médico inglês Frederick Twort, independente um do outro, descobriu os bacteriófagos. D'Herelle, no entanto, foi o pioneiro na exploração do potencial terapêutico desses vírus. A palavra "fago" significa "devorador" em grego, refletindo a capacidade desses vírus de infectar e destruir bactérias específicas. A fagoterapia rapidamente ganhou popularidade como uma alternativa aos antibióticos, especialmente antes da descoberta e produção em massa desses medicamentos (Barbosa et al., 2022).

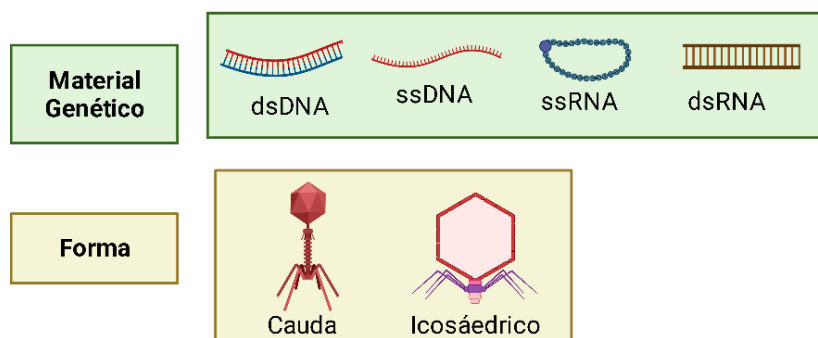
Durante as décadas de 1920 e 1930, a fagoterapia foi amplamente utilizada em diversos países, principalmente na União Soviética e na Europa Oriental, para tratar uma variedade de infecções bacterianas. No entanto, com o advento dos antibióticos, a fagoterapia foi em grande parte esquecida em muitas partes do mundo ocidental, pois os antibióticos eram considerados uma alternativa mais fácil de administrar e mais amplamente eficaz. Recentemente, devido ao aumento da resistência bacteriana aos antibióticos e à necessidade de encontrar novas abordagens terapêuticas, a fagoterapia ressurgiu como uma área de intensa pesquisa (Vieira et al., 2021).

A busca por alternativas aos antibióticos tradicionais impulsionou estudos clínicos e experimentais para avaliar a eficácia e a segurança da fagoterapia em diferentes contextos médicos. Hoje, a fagoterapia representa uma abordagem promissora no tratamento de infecções bacterianas resistentes aos antibióticos. A pesquisa continua a explorar o potencial terapêutico dos fagos, considerando fatores como especificidade de hospedeiro, segurança e desenvolvimento de formulações estáveis. A fagoterapia oferece uma perspectiva intrigante para o futuro da medicina, destacando a importância de abordagens inovadoras e sustentáveis no combate às infecções bacterianas (Rodríguez et al., 2020).

3.4.2 Caracterização

Os bacteriófagos, entidades ubíquas no meio ambiente, são encontrados em diversas localidades, desde oceanos e solos até ambientes extremos com temperaturas extremamente baixas ou altas, e até mesmo no interior do intestino humano. Esses fagos compreendem vírus com diferentes tipos de material genético, como DNA de fita dupla (dsDNA), DNA de fita simples (ssDNA), DNA de fita simples com RNA (ssRNA) e RNA de fita dupla (dsRNA). A maioria dos fagos, aproximadamente 96%, possui uma estrutura de cauda, enquanto os fagos sem cauda são denominados "cúbicos", filamentosos ou pleomórficos, constituindo menos de 4% do total. O termo "cúbico" refere-se à simetria cúbica com forma icosaédrica, podendo alguns tipos conter lipídios em envelopes ou constituintes (Figura 22) (Ackermann, 2009).

Figura 22- Caracterização dos bacteriófagos.

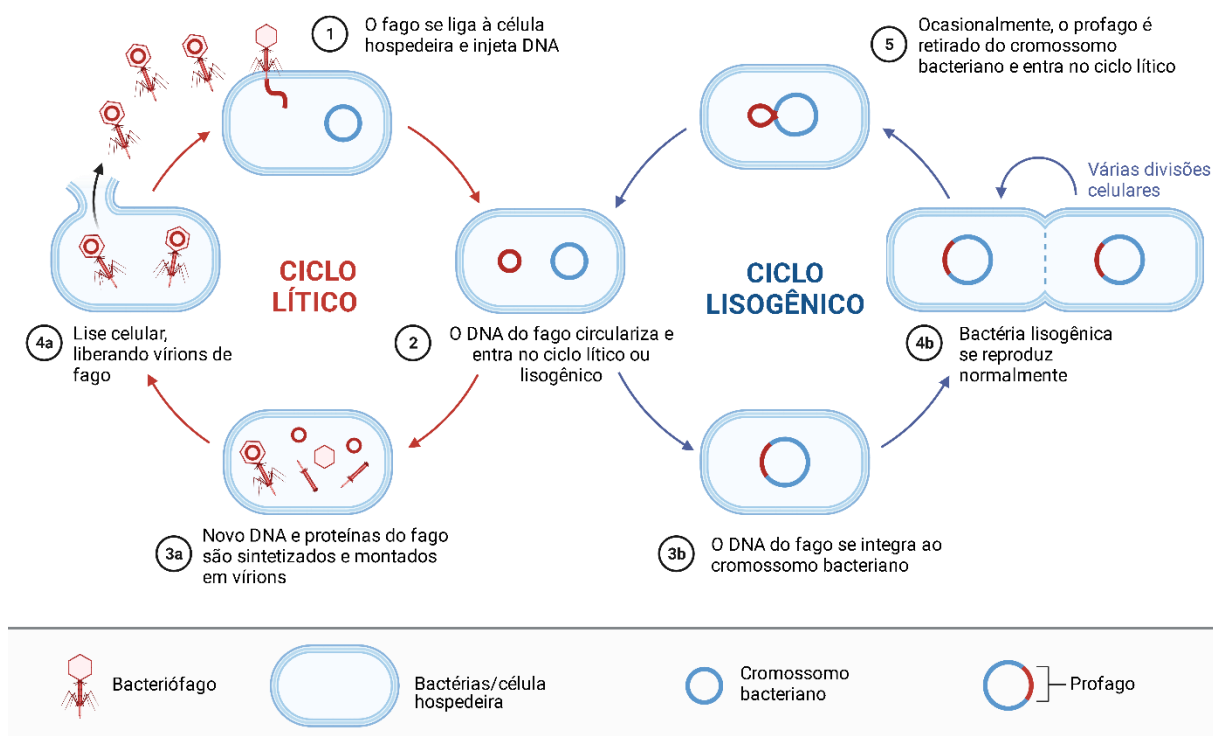


Fonte: Elaborado pela autora, 2023. Usando a plataforma de edição BioRender. Disponível em: <<https://www.biorender.com/>>. Acesso em: 12 nov. 2023.

Recentemente, as famílias *Myoviridae*, *Podoviridae* e *Siphoviridae* foram abolidas devido a avaliações independentes que as consideraram polifiléticas, não refletindo de maneira precisa histórias evolutivas compartilhadas. No entanto, reconhece-se a importância de identificadores morfológicos, como "miovírus", "podovírus" e "sifovírus", para descrever características distintas sem implicações taxonômicas formais. Adicionalmente, a ordem *Caudovirales* foi substituída pela classe *Caudoviricetes*, agrupando todos os vírus bacterianos e de arqueias com caudas, capsídeos icosaédricos e DNA de fita dupla (Turner et al., 2023).

Em relação à caracterização dos ciclos de vida dos fagos, estes podem ser classificados como líticos, temperados ou crônicos. Os fagos líticos, por meio da adsorção, se conectam a receptores específicos na membrana celular bacteriana. Após a adsorção, os fagos inserem seu material genético no citoplasma bacteriano, iniciando a transcrição e tradução de proteínas fágicas com a ajuda da maquinaria celular bacteriana para a replicação. Ao completarem a montagem, induzem a lise celular, liberando novos *virions* para infectar outras células bacterianas (Figura 23) (Hobbs; Abedon, 2016).

Figura 23 – Ciclo de vida dos bacteriófagos.



Fonte: Aman; Ciobanu, 2011. Adaptado da plataforma de edição BioRender. pela autora, 2023. Disponível em: <<https://www.biorender.com/>>. Acesso em: 07 nov. 2023.

Os fagos temperados seguem etapas semelhantes, mas, em vez de lisar as células hospedeiras, integram-se ao genoma bacteriano formando um profago, que replica com o cromossomo hospedeiro e é transferido verticalmente através da divisão celular. O ciclo lisogênico, onde o fago se replica como um profago, proporciona imunidade contra infecções pelo mesmo fago. Condições de estresse podem induzir a mudança para o ciclo lítico. Fagos crônicos, por sua vez, adsorvem à célula, inserem seu material genético e geram infecções produtivas, liberando vírions em intervalos longos, sem interrupção substancial das células hospedeiras (Aman; Ciobanu, 2011).

3.4.3 Potencial terapêutico dos bacteriófagos

Os avanços na biologia molecular e nas técnicas de sequenciamento abriram novas perspectivas para a aplicação dos bacteriófagos, incluindo a utilização de fagos geneticamente modificados, a combinação de fagos com antibióticos e enzimas derivadas de fagos, como as endolisinas com propriedades hidrolíticas do peptidoglicano, essenciais para a viabilidade bacteriana. Esses agentes microbianos demonstram um vasto potencial em diversas aplicações biotecnológicas, abrangendo setores como alimentação, agricultura animal, medicina humana, veterinária e ciências ambientais (Chen et al., 2022).

Em humanos, esses agentes têm sido estudados como uma alternativa para infecções resistentes a antibióticos, onde os fagos podem preencher a lacuna quando os tratamentos convencionais falham. Além disso, o uso de bacteriófagos em animais, como gado e aves, visa reduzir infecções bacterianas e melhorar a segurança alimentar. Destaca-se, sobretudo, o papel terapêutico dos bacteriófagos na eliminação de bactérias responsáveis por infecções, incluindo aquelas que formam biofilmes. Para enfrentar a seleção de bactérias resistentes, têm sido desenvolvidos *cocktails* de fagos, direcionados a uma espécie específica (Milho et al., 2019).

Entretanto, *cocktails* contendo fagos com alvos diferentes mostraram potencial contra infecções polibacterianas. Centros especializados, como o Center for *Innovative Phage Applications and Therapeutics* (IPATH), estão utilizando terapia fágica em pacientes com infecções multirresistentes com risco de vida por meio de programas de uso compassivo aprovados pela *Food and Drug Administration* (FDA). Os bacteriófagos desempenham um papel crucial na segurança alimentar, possibilitando a eliminação de bactérias patogênicas como *Salmonella*, *Campylobacter*, *Listeria monocytogenes* e *Escherichia coli*. Em 2006, a FDA aprovou a utilização de preparações de bacteriófagos em alimentos prontos-a-comer com agentes antimicrobianos contra *Listeria monocytogenes*, reconhecendo a eficácia desses agentes nessa área (Figura 24) (Breyne et al., 2017; Ngassam-Tchamba et al., 2020; Titze; Kromker, 2020).

Figura 24 – Áreas de aplicações dos bacteriófagos.



Fonte: Elaborado pela autora, 2023. Usando a plataforma de edição BioRender. Disponível em: <<https://www.biorender.com/>>. Acesso em: 15 out. 2023.

Após mais de cem anos desde a descoberta dos bacteriófagos e sua introdução na comunidade científica, observa-se que ainda há muito a ser explorado em relação à sua aplicação como agentes terapêuticos no combate a infecções causadas por bactérias multirresistentes. O alerta emitido pela Organização Mundial da Saúde (OMS) em 2015 e 2021 ressalta a necessidade de abordagens inovadoras, incluindo o uso de bacteriófagos, diante do

uso abusivo de antibióticos e da lacuna no desenvolvimento de novos antibióticos (AGRI, 2022).

O relatório do Programa de Prevenção e Controle de Infecção e Resistências aos Antimicrobianos (PPCIRA) da Direção-Geral da Saúde (DGS) revela uma prevalência de resistência bacteriana, entre 2014 e 2017, associada a diversas estirpes microbianas, incluindo *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *P. aeruginosa*, *Streptococcus pneumoniae*, *Acinetobacter* spp., *Staphylococcus aureus* e *Enterococcus* spp. Essa resistência é particularmente preocupante nas infecções hospitalares, onde estirpes multirresistentes circulam com frequência, representando um risco significativo para os pacientes (EFSA, 2016; Reinhard et al., 2023).

No entanto, apesar do seu potencial terapêutico promissor, o uso de bacteriófagos ainda enfrenta desafios significativos. Questões regulatórias, a necessidade de estudos clínicos robustos e a compreensão aprofundada das interações fago-hospedeiro são áreas em desenvolvimento contínuo. Todavia, a seleção cuidadosa de bacteriófagos específicos para garantir segurança e eficácia é crucial (Chen et al, 2022).

3.4.4 Vantagens da fagoterapia comparativamente com à antibioticoterapia

Os mecanismos de ação e de resistência da fagoterapia e antibioterapia são bem distintos, o que faz do uso dos bacteriófagos uma possível inovação biotecnológica para o tratamento de infecções multirresistentes. Apesar do espectro de ação dos fagos ser restrito quando comparados aos antibióticos, essa desvantagem se torna uma vantagem, dado que, quando uma bactéria se torna resistente a um determinado fago, permanece susceptível ao demais que possuem espectro semelhante, ao contrário do que acontece na antibioterapia (Oliveira, 2021).

Outra vantagem do uso da fagoterapia como uma ferramenta terapêutica é que devido a elevada especificidade dos bacteriófagos, há uma redução do impacto na flora comensal propiciando dessa forma, a inibição de infecções secundárias, constantemente associadas ao uso da antibioterapia de largo espectro. A administração de uma pequena dose inicial de fagos é o suficiente para o sucesso terapêutico, sendo também vista como uma das inúmeras vantagens do uso da fagoterapia em função de, tornar possível reduzir os custos da terapia como também, a probabilidade de efeitos colaterais, uma vez que a lise bacteriana gera a liberação de novos bacteriófagos no local da infecção e esses são aptos a infectar as demais células susceptíveis, ao contrário dos antibióticos que necessitam de uma posologia continua (Da Silva; Giordani; Macedo, 2013).

Contudo, a utilização dos fagos para tratamento de infecções associadas a produção de biofilmes bacterianos, a possibilidade de sua utilização como substituto do antibiótico em casos de alergias, o fato dos bacteriófagos serem os microrganismos mais abundantes e diversos no ambiente, e por seu processo de produção e otimização serem mais simples, rápidos e mais acessíveis economicamente, tem dado destaque para a utilização da fagoterapia como uma ferramenta biotecnológica e terapêutica substituta da antibioterapia e de grande valorização na medicina moderna (Da Silva, 2013).

4 MÉTODOS

4.1 AMOSTRAGEM

4.1.1 Elementos de Titânio

As amostras de elementos de titânio utilizadas, foram cedidas pelo Centro de Ensino e Pesquisas em Implantes Dentários da Universidade Federal de Santa Catarina – CEPID/UFSC. Um total de 100 corpos de prova circulares apresentando dimensões de 5 mm de diâmetro e 3 mm de espessura, totalizando uma área superficial de 19,64 mm², obtidos a partir do corte da superfície de barra de titânio puro GR4, com certificado de qualidade nº 0277/2019 conforme ISO 13485 e ISO 9001 (Anexo A), foram utilizados como amostras. Posteriormente, os fragmentos foram limpos e descontaminados com detergente enzimático e submetidos a autoclavação conforme protocolo de esterilização. Todo o material foi acomodado em placas de Petri e secos em estufa, e 1% dos fragmentos de cada material, incubado em caldo *Brain Heart Infusion* (BHI), a 35 °C por 24 horas, para garantir a inocuidade dos elementos de titânio.

4.2 MICRORGANISMOS E CONDIÇÕES DE CULTIVO

4.2.1 *Pseudomonas aeruginosa*

As cepas bacterianas de *P. aeruginosa* utilizadas neste trabalho, foram provenientes de isolados clínicos de caldo de cultivo (tioglicolato) advindos de tecidos de pacientes e do banco *American Type Culture Collection* (ATCC® 27853™), gentilmente cedidas pelo Laboratório de Biologia Molecular, Microbiologia e Sorologia do Hospital Universitário Polydoro Emani de São Thiago da Universidade Federal de Santa Catarina (LBMMS/HU/UFSC), sendo a espécie clínica identificada por oxidase e ágar cetrímide incubado a 37 °C e a 42 °C, com confirmação em sistema Vitek Vitek – teste de confirmação e série bioquímica.

As bactérias do estoque trabalho foram mantidas em meio sólido de Ágar Nutriente a 4 °C, distribuídas em tubos de ensaio inclinados. Para o cultivo bacteriano, utilizou-se o meio Caldo Infusão de Cérebro e Coração (*Brain Heart Infusion*, Kasvi), com preparo conforme recomendação do fabricante. As bactérias foram inoculadas e propagadas em 25 mL de Caldo

BHI, incubadas em estufa bacteriológica a 37 °C, por 16 horas, até atingir densidade ótica (DO) de 0,6 a 0,9 (580nm), a fim de se obter as amostras para os ensaios.

Em relação aos inóculos, um pequeno número de colônias cultivadas previamente em BHI foi adicionada individualmente a 100 mL de caldo BHI e incubada a 37 °C por 6 horas, período estabelecido previamente por curvas de crescimento. A cada 30 minutos, foram avaliados 2 mL do material em crescimento e realizadas medidas de absorvância até ser atingida a absorvância de 0,1, valor correspondente a 7 Log de unidades formadoras de colônia (UFC) por mililitro da suspensão. Posteriormente, 1 mL da suspensão foi transferido para 99 mL de caldo BHI para se obter um inóculo inicial de 5 Log de UFC.mL⁻¹, que foi utilizado nos experimentos descritos a seguir.

4.2.2 Bacteriófagos

Os bacteriófagos testados foram provenientes do banco de vírus do Laboratório de Virologia Aplicada, classificados morfológicamente por Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET). Tais fagos, computando 5 tipos, foram testados e apresentaram capacidade de crescimento com perfil lítico em *P. aeruginosa*, seguindo metodologia de dupla camada de ágar (SEJAS et al., 2003).

As cinco possíveis coleções multifágicas foram isoladas do caldo de cultivo bacteriológico provenientes de amostras de descarte de tecido humano: osso, tendão e pele. A nomenclatura dos bacteriófagos se deu por meio da associação da bactéria alvo PA (*P. aeruginosa*), local de isolamento, PB (proximal bone - osso proximal em português), T (tendo - tendão) e S (skin - pele) de acordo com o descrito.

Com o intuito de padronização dos procedimentos, realizou-se novo isolamento e produção de cultura estoque de cada bacteriófago utilizado, conforme as etapas descritas: em placa de meio de cultura sólido, foi realizado a semeadura da bactéria *P. aeruginosa* e junto dela a suspensão do bacteriófago hospedeiro, incubado por 24 horas a 37° C. Após incubação, o crescimento foi observado conforme as placas de lise, seguindo pela adição do Caldo Nutriente estéril na superfície da cultura sólida.

As culturas dos bacteriófagos viáveis e de identidade confirmadas foram obtidas por meio do sobrenadante dos testes de fagotipagem, ambos foram titulados e criopreservados a -80 °C, em 1000 µL em tubos tipo Eppendorf seguindo técnica convencional de criopreservação de bacteriófagos. Para a realização dos experimentos cada alíquota foi descongelada e reativada. Para a propagação dos bacteriófagos, utilizou-se as alíquotas descongeladas, sendo transferidas para um frasco Erlenmeyer contendo 25 mL de caldo BHI e 1 mL do cultivo

bacteriano em fase exponencial de crescimento. A mistura foi incubada em estufa bacteriológica a 37 °C por 12 horas.

Posteriormente, os tubos foram centrifugados a 10.000 x g por 5 minutos a 4 °C para separação das células bacterianas. O sobrenadante filtrado em filtros de acetato de celulose com poros de 0,22 µm para obtenção de partículas virais purificadas. Foram realizadas três passagens sucessivas a fim de obter o aumento da concentração de bacteriófagos. A avaliação do título viral foi determinada por intermédio da contagem de unidade formadora de placa de lise (PFU), submetida a equação disposta abaixo (Quadro 1).

Quadro 1 – Equação para determinação do título viral.

$$UFP = \frac{\text{Número de placas contabilizadas} \times \text{Recíproca da diluição}}{\text{Volume}}$$

Fonte: A autora, 2023.

4.3 INDUÇÃO DE BIOFILMES *IN VITRO*

4.3.1 Confirmação da capacidade produtora de biofilmes das cepas clínica e ATCC® 27853™ de *Pseudomonas aeruginosa*

A fim de verificar se as cepas de *P. aeruginosa* do estudo eram produtoras de biofilme, foi padronizado a técnica de formação de biofilme em microtitulação de poliestireno pelo método de Cristal Violeta descrito por Stepanovic et al., (2007) com pequenas modificações. Foram preparados 200 mL de meio BHI e um inóculo de 5 log de UFC.mL⁻¹ padronizado pela escala de McFarland no valor de 0,5. Os poços da placa de microtitulação foram preenchidos sequencialmente com alíquotas de 180 µL de caldo BHI e 20 µL do inóculo bacteriano. Cada microrganismo a ser testado ocupou 32 cavidades da placa, ou seja, 32 repetições. No controle negativo, transferiu-se somente 200 µL de caldo BHI para oito poços (oito repetições).

A metodologia seguiu as etapas de incubação, fixação, coloração e leitura das absorbâncias na placa de microtitulação, respectivamente. A avaliação de formação de biofilme foi realizada através da leitura da absorbância de cada poço utilizando-se leitor de placas, em comprimento de onda de 620 nm. O ponto de corte correspondeu-se ao valor médio das absorbâncias do controle negativo somado a três desvios padrão. Para interpretação dos dados, foram considerados os valores médios da leitura de absorbância de acordo com a equação de Stepanovic et al., 2007. As amostras foram classificadas como fortemente (absorbância média

superior a quatro vezes o ponto de corte) ou moderadamente (absorbância média entre duas e quatro vezes o ponto de corte) produtoras de biofilmes. As não produtoras foram aquelas com valor de absorbância igual ou inferior ao ponto de corte.

4.3.2 Indução de biofilme em elementos de titânio

Para indução de biofilme sobre os corpos de titânio, realizou-se ensaios individuais utilizando-se cepas de *P. aeruginosa* clínica e ATCC. Para tanto, 20 µL do inóculo bacteriano (5 Log de UFC.mL⁻¹) foi transferido para uma microplaca de 24 cavidades contendo 980 µL de caldo BHI. Os elementos de titânio foram imersos no meio contendo a suspensão bacteriana com o auxílio de uma pinça longa estéril e incubados a 37 °C, pelo período de 4 dias, conforme adaptado do estudo de Freitas; Sand e Simonetti (2010). Uma placa contendo somente os elementos de titânio e o meio nutriente, foi preparada e incubado sob condições semelhantes e utilizada como controle negativo do experimento. A cada dois dias, os fragmentos foram transferidos para um novo meio nutriente contendo 1 mL de BHI, sendo lavados previamente com solução salina para remoção de células planctônicas. Para cada bactéria testada, o experimento foi realizado em triplicata.

4.4 CONTROLE DE BIOFILME MEDIADO POR BACTERIÓFAGOS

A avaliação e incorporação de bacteriófagos no controle de biofilmes em corpos de prova de titânio foi realizado mediante aplicação de 1 mL da solução de cada um dos bacteriófagos isolados (10^3 a 10^5 UFP.mL⁻¹), sendo conduzido dois experimentos separados e destrutivos:

- **Experimento 1:** atividade de desagregação e destruição de biofilmes bacterianos estabelecido;
- **Experimento 2:** atividade profilática dos bacteriófagos no combate à formação de biofilme.

No experimento 1 os biofilmes foram gerados sob os corpos de prova de titânio e os fagos usados para fins de desagregação do biofilme. Os corpos de prova contendo bactérias e bacteriófagos foram incubados a 37 °C por 24 horas. Já no experimento 2 os fagos foram disponibilizados nos corpos de prova estéreis, ocasionando uma adição simples, na qual se deixaram os fagos adsorver *overnight* às superfícies. Após, adsorção foi realizada a propagação

do biofilme em conformidade com a técnica adotada para a indução de biofilme na superfície de titânio.

Os discos pós-tratamento foram incubados por 4 dias, em microplaca de 24 cavidades contendo 1 mL de caldo BHI, a cada dois dias, os fragmentos foram transferidos para um novo meio nutriente contendo 1 mL de BHI, visando a avaliação da atividade profilática. Ambos os experimentos foram realizados em três concentrações distintas sendo, baixa dose (multiplicidade de infecção - MOI 0,01), dose intermediária (multiplicidade de infecção - MOI 0,1) e alta dose (multiplicidade de infecção - MOI 1).

Contudo, a atividade de controle e profilaxia dos biofilmes foram verificadas por contagem de células viáveis, seguido de observação microscópica utilizando Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) (Rosa, 2015).

4.5 AVALIAÇÃO DA REDUÇÃO DE BIOFILME

4.5.1 Contagem de células viáveis

Para efetuar a contagem de bactérias viáveis aderidas nos espécimes tratados e não tratados, o fragmento, após ser retirado do meio nutriente, foi lavado brevemente em solução salina. Em seguida, o biofilme que permaneceu aderido foi removido da superfície metálica com o auxílio de um “*swab*” e imerso em um tubo contendo 2 mL de água destilada estéril. O “*swab*”, contendo células removidas, foi submetido à agitação por “vórtex” durante 2 minutos. Na sequência, após descarte do “*swab*”, o tubo contendo o fragmento foi novamente submetido ao “vórtex” por mais 1 minuto.

Posteriormente, retirou-se do tubo 10 μL da suspensão obtida e realizado a diluição à base 10 em microplacas de 96 cavidades contendo 90 μL de tampão fosfato-salino (PBS), até obtenção de diluições que variam entre 10^{-2} e 10^{-10} , de modo a se obter colônias em número seguro para contagem em placa (3 e 30 colônias). Após a diluição, volumes de 10 μL foram inoculados por gotejamento vertical em placas de petri contendo meio BHI, após a transferência das diluições as placas foram mantidas abertas em cabine de fluxo laminar para secagem das gotas, sucedendo da incubação por 24 horas a 37 °C. Este procedimento também foi realizado em triplicata. A contagem de células foi realizada de acordo com cálculo descrito por Chaves (2004).

4.5.2 Avaliação qualitativa por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

A avaliação dos espécimes de titânio com e sem biofilmes, tratado e não tratados, foi realizado por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), por meio da parceria entre o Laboratório de Virologia Aplicada (LVA/UFSC) e o Laboratório Central de Microscopia Eletrônica (LCME/UFSC). Para isso, os elementos foram encaminhados e preparados, após a realização dos protocolos de cultivo do biofilme e tratamento com os bacteriófagos.

O preparo das amostras para microscopia eletrônica de varredura foi conforme método preconizado por Castro (2002), com algumas modificações. Os fragmentos, após serem retirados da suspensão, foram lavados em solução salina estéril por 1 minutos. Posteriormente, fixado em glutaraldeído 2,5% por um período mínimo de 12 horas. Após a fixação, os materiais foram imersos em etanol para desidratação. A imersão aconteceu em concentrações crescentes de etanol 30, 50, 70, 90 e 100%, intercalando-se 30 minutos a cada troca. Ao final da desidratação, as amostras foram imersas em tetróxido de ósmio a 1% durante uma hora.

As amostras foram secas por secagem química com solução de hexametildissilazano (HMDS) e submetidas à metalização em ouro, utilizando-se o equipamento Metalizador Sputter Coater Bal-Tec SDC 050, para isso, os espécimes foram fixados sobre uma base de alumínio com fita condutora adesiva dupla face, posicionados na máquina para metalização pulverização, por dois minutos, promovendo a deposição de uma fina camada de ouro (10 nm) sobre as amostras. Após a metalização, os elementos foram fixados com fita carbono dupla face das amostras no *strub* metálico. Ao final os fragmentos foram observados ao microscópio eletrônico de Varredura para obtenção das imagens sob aumentos de 100x, 1000x e 10.000x.

4.5.3 Avaliação quantitativa por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

De posse das micrografias, para as análises quantitativas de redução do biofilme nas superfícies de elementos de titânio, utilizou-se o software ImageJ[®] versão 1.49, de linguagem Java, disponível no site <http://rsweb.nih.gov/ij>. Para cada grupo experimental, utilizou-se 5 imagens digitais, totalizando 50 imagens, referente aos cinco bacteriófagos utilizados, nas três doses aplicadas e as duas cepas de *P. aeruginosa*. As imagens foram padronizadas para que mantivessem uma escala adequada, com a intenção de diminuir incertezas e aumentar a precisão dos dados obtidos.

Determinou-se estimativas de porcentagem de área total ocupado pelo biofilme (em preto) e o disco exposto (em branco) conforme demonstrado na figura 25. As imagens foram processadas e salvas no formato TIFF (Etiqueta Imagem Arquivo Formato), ambiente usado no processo de binarização e análise das imagens. Os valores encontrados de porcentagem foram

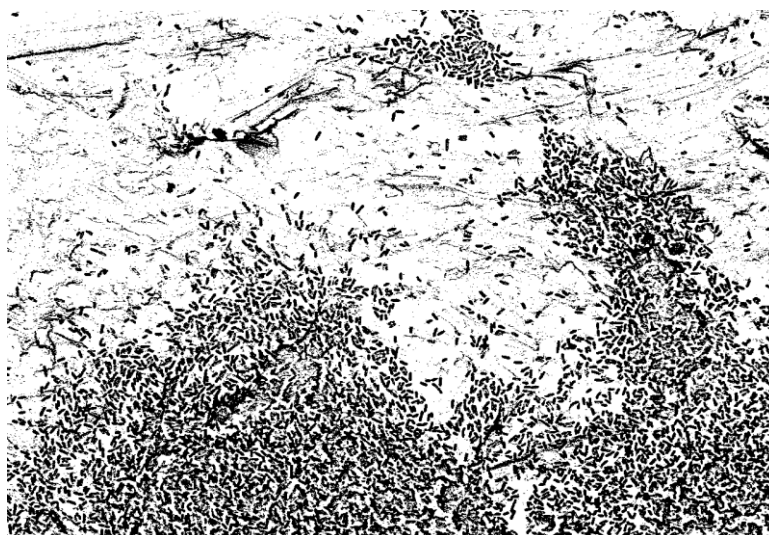
utilizados para cálculo da redução percentual, sendo: diferença entre o valor inicial (elemento não tratado) e o novo valor (elemento tratado) $a - b$, dividido pelo valor absoluto inicial (elemento não tratado) (Quadro 2).

Quadro 2 - Equação para cálculo de redução percentual.

$$r (\%) = \left(\frac{a-b}{a} \right) \times 100.$$

Fonte: Elaborado pela autora, 2023.

Figura 25 – Modelo experimental de binarização das micrografias para estimativa da redução percentual do biofilme de *Pseudomonas aeruginosa* em superfície de titânio.



Fonte: Elaborado pela autora, 2023, por meio do software de edição e análise ImageJ® versão 1.49, de linguagem Java. Disponível em: < <http://rsweb.nih.gov/ij> >. Acesso em: 02 nov. 2023.

4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados obtidos foram submetidos à análise variância de duas vias, *Two-Way* ANOVA, com o objetivo de comparar a média da população amostral, e assim identificar se essas médias diferiram significativamente entre si. O nível de significância estatística foi de $p < 0,05$. Para a comparação dos grupos, utilizou-se o teste de Tukey. As análises foram realizadas pelo software GraphPad Prism 8.0. Os resultados que não sustentaram o procedimento inferencial, foram apresentados de maneira descritiva.

5 RESULTADOS

5.1 CARACTERIZAÇÃO DAS CEPAS DE *Pseudomonas aeruginosa* FRENTE AO PERFIL DE SENSIBILIDADE ANTIMICROBIANA E FORMAÇÃO DE BIOFILME

5.1.1 Perfil de sensibilidade antimicrobiana

As tabelas 1 e 2, apresentam o perfil de sensibilidade microbiana frente aos antibióticos testados para as cepas ATCC® 27853™ e clínica. Observa-se que dentre os antibióticos utilizados foram selecionadas classes antimicrobianas de interesse para bactérias gram-negativas e não comumente utilizados para tal gênero. Verifica-se também, medicamentos aplicados na saúde humana e animal.

Tabela 1 – Perfil de sensibilidade antimicrobiana da cepa clínica de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC® 27853™.

Nomeclatura	Sigla	Classe	Halo (mm)	CLSI	
Polimixina B	POL	Polimixina	0	R	R
Azitromicina	AZI 15	Macrolídeos: Subclasse: Azalídeos	21,9	N/A	N/A
Ampicilina	AMP 10	Penicilina	0	R	R
Rifampicina	RIF 30	Macrocíclicos: Rifamicinas	11,7	N/A	N/A
Netilmicina	NET 30	Aminoglicosídeos	21,1	EI	N/A
Ceftriaxona	CRO 30	Cefalosporinas	19,2	N/A	N/A
Bacitracina	BA	Polipeptídico	0	R	R
Oxacilina	OXA 1	Beta-lactâmico	0	R	R
Cefoxitina	CFO 30	Cefalosporinas	0	R	R
Norfloxacina	NOR 10	Fluoroquinolonas	24,3	N/A	S
Sulfazotrim	SUT 25	Sulfonamidas	0	R	R
Enrofloxacina	ENO 5	Quinolonas	17,6	N/A	N/A
Gentamicina	GEN 10	Aminoglicosídeo	20,9	EI	S
Cefalotina	CFL 30	Cefalosporinas	0	R	R
Cefotaxima	CTX 30	Cefalosporinas	15,9	N/A	N/A
Amoxicilina	AX 10	Penicilina	0	R	R
Clindamicina	CU 2	Lincosamidas	0	R	R
Sulfato de colistina	CS 109	Polimixina	17,8	N/A	N/A
Fosfomicina	FOS 200	Fosfônicos	31,5	N/A	N/A
Cefuroxime sodium	CXM	Cefalosporinas	0	R	R
Vancomicina	VC 30	Glicopeptídeos	0	R	R
Ácido Pipemídico	PIP 20	Quinolonas	16,2	N/A	N/A
Penicilina G/ Benzilpenicilina	PEN 10	Penicilina	0	R	R
Ceftiofur	CTF 30	Cefalosporinas	18,1	N/A	N/A
Nitrofurantoína	NIT 300	Nitrofuranos	0	R	R
Ácido nalidíxico	NAL 30	Quinolonas	3,4	N/A	N/A

Nota: Perfil de sensibilidade obtido por meio da realização do teste antibiograma, apresentando os antibióticos e os halos em mm, sendo S= sensível, R= Resistente, N/A= Não se aplica e EI= Evidência insuficiente de que o microrganismo ou grupo seja um bom alvo para a terapia com o antimicrobiano testado, sem ponto de corte. Ambos foram classificados com a utilização dos pontos de corte via BrCAST e CLSI, porém a RDC Anvisa nº 786/2023 torna obrigatório o uso do BrCast para classificação dos testes brasileiros. Fonte: Adaptado de Tell, (2023).

Entretanto, considerando os 26 antibióticos testados, a cepa ATCC® 27853™ foi sensível a Gentamicina e Norfloxacina (7,7%) (Tabela 1), enquanto a cepa clínica sensível a Gentamicina e Plimixina B (Tabela 2), havendo resistência aos demais 24 antibióticos testados (92,3%) em ambas as cepas, contudo as cepas testadas tratam-se de *Pseudomonas aeruginosa* multirresistentes.

Tabela 2 – Perfil de sensibilidade antimicrobiana da cepa clínica de *Pseudomonas aeruginosa*.

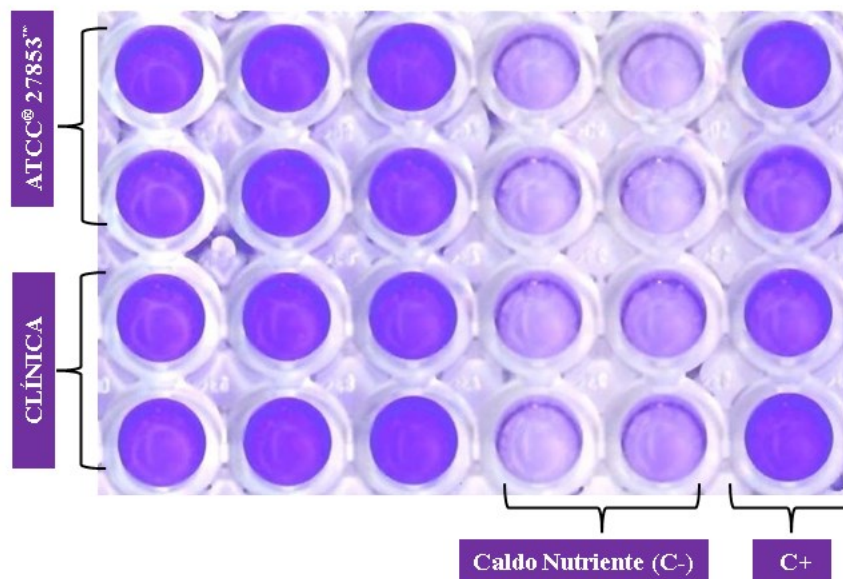
Nomeclatura	Sigla	Classe	Halo (mm)	BrCAST	CLSI
Polimixina B	POL	Polimixina	18,3	S	N/A
Azitromicina	AZI 15	Macrolídeos: Subclasse: Azalídeos	29,7	N/A	N/A
Ampicilina	AMP 10	Penicilina	0	R	R
Rifampicina	RIF 30	Macroclícos: Rifamicinas	13,3	N/A	N/A
Netilmicina	NET 30	Aminoglicosídeos	22,8	EI	N/A
Ceftriaxona	CRO 30	Cefalosporinas	18,1	N/A	N/A
Bacitracina	BA	Polipeptídico	0	R	R
Oxacilina	OXA 1	Beta-lactâmico	0	R	R
Cefoxitina	CFO 30	Cefalosporinas	0	R	R
Norfloxacina	NOR 10	Fluoroquinolonas	36,5	N/A	S
Sulfazotrim	SUT 25	Sulfonamidas	0	R	R
Enrofloxacin	ENO 5	Quinolonas	22,35	N/A	N/A
Gentamicina	GEN 10	Aminoglicosídeo	23,05	EI	S
Cefalotina	CFL 30	Cefalosporinas	0	R	R
Cefotaxima	CTX 30	Cefalosporinas	14,6	N/A	N/A
Amoxicilina	AX 10	Penicilina	0	R	R
Clindamicina	CU 2	Lincosamidas	0	R	R
Sulfato de colistina	CS 109	Polimixina	19,7	N/A	N/A
Fosfomicina	FOS 200	Fosfônicos	35,6	N/A	N/A
Cefuroxime sodium	CXM	Cefalosporinas	0	R	R
Vancomicina	VC 30	Glicopeptídeos	0	R	R
Ácido Pipemídico	PIP 20	Quinolonas	17,15	N/A	N/A
Penicilina G/ Benzilpenicilina	PEN 10	Penicilina	0	R	R
Ceftiofur	CTF 30	Cefalosporinas	16,05	N/A	N/A
Nitrofurantóina	NIT 300	Nitrofuranos	0	R	R
Ácido nalidíxico	NAL 30	Quinolonas	0	R	R

Nota: Perfil de sensibilidade obtido por meio da realização do teste antibiograma, apresentando os antibióticos e os halos em mm, sendo S= sensível, R= Resistente, N/A= Não se aplica e EI= Evidência insuficiente de que o microrganismo ou grupo seja um bom alvo para a terapia com o antimicrobiano testado, sem ponto de corte. Ambos foram classificados com a utilização dos pontos de corte via BrCAST e CLSI, porém a RDC Anvisa nº 786/2023 torna obrigatório o uso do BrCast para classificação dos testes brasileiros. Fonte: Adaptado de Tell, (2023).

5.1.2 Formação de biofilme

Na Figura 26, visualiza-se a formação de biofilme das cepas clínica e ATCC® 27853™ de *P. aeruginosa* por meio da técnica de formação de biofilme em microtitulação de poliestireno usando coloração Cristal Violeta. Após ensaio, observou-se produção de biofilme, ambas as cepas foram classificadas como fortemente produtoras de biofilme.

Figura 26 – Ensaio de formação de biofilme de cepas de *Pseudomonas aeruginosa* em placas de microtitulação de poliestireno pelo método de Cristal violeta.



Fonte: Elaborado pela autora, 2023.

5.2 CONTROLE DE BIOFILME MEDIADO POR BACTERIÓFAGOS: TRATAMENTO

5.2.1 Contagem de células viáveis

A tabela 3, apresenta a taxa de sobrevivência de células viáveis após tratamentos com os bacteriófagos para cada infecção testada. Nota-se que, ambos os fagos foram capazes de infectar e reduzir as células bacterianas viáveis, porém não o suficiente para erradicação. Desse modo, os resultados não seguiram um padrão quanto a dose-dependência e na variação entre host-hospedeiro, não sendo possível inferir relação causa-efeito.

Tabela 3 – Células viáveis recuperadas de biofilme de *Pseudomonas aeruginosa* pós-tratamento com bacteriófagos em biofilme maduro na superfície de titânio.

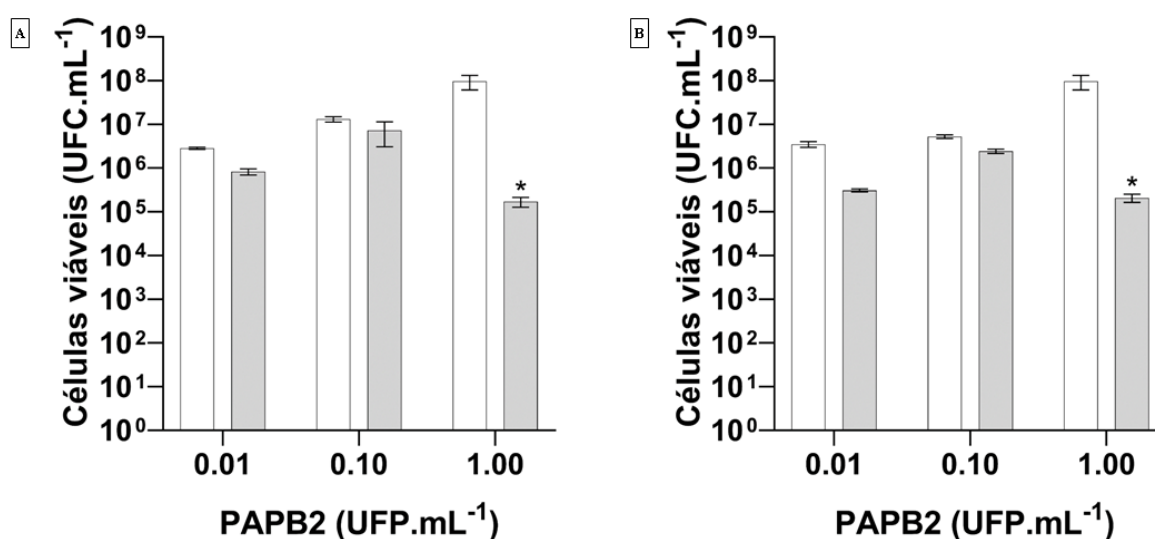
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Bacteriófagos	Concentração (UFP/UFC)	Taxa de sobrevivência (%)
ATCC® 27853™	PAT4	0,01	46,70
	PAT4	0,1	26,15
	PAT4	1	35,06
	PAPB2	0,01	28,9
	PAPB2	0,1	55,42
	PAPB2	1	8,62
	PAPB5	0,01	20,30
	PAPB5	0,1	62,31
	PAPB5	1	8,84
	PAPB7	0,01	27,83
	PAPB7	0,1	37,1
	PAPB7	1	18,15
	PAS2	0,01	61,63
	PAS2	0,1	8,84
	PAS2	1	26,53
CLÍNICA	PAT4	0,01	3,25
	PAT4	0,1	3,20
	PAT4	1	7,84
	PAPB2	0,01	8,81
	PAPB2	0,1	46,29
	PAPB2	1	0,22
	PAPB5	0,01	69,93
	PAPB5	0,1	76,95
	PAPB5	1	81,20
	PAPB7	0,01	31,63
	PAPB7	0,1	34,27
	PAPB7	1	53,79
	PAS2	0,01	12,41
	PAS2	0,1	61,53
	PAS2	1	33,82

Nota: Onde, 0,01 0.1 e 1 correspondem aos índices de multiplicidade de infecção viral (UFP/UFC). UFC= Unidade Formadora de Colonias por mL; UFP= Unidade formado de placa por mL. As taxas foram calculadas considerando as médias de três experimentos independentes. Fonte: Elaborado pela autora, 2023..

As figuras abaixo (27, 28, 29, 30 e 31), denotam a avaliação da redução de células viáveis recuperadas do biofilme das cepas clínica e ATCC® 27853 de *P. aeruginosa* antes e após tratamento com os bacteriófagos PAPB2, PAPB5, PAPB7, PAS2 e PAT4, respectivamente, em diferentes concentrações.

Para o bacteriófago PAPB2 (Figura 27), considerando a média e o desvio padrão, é possível analisar a redução do número de UFC/mL em todas as concentrações testadas (tratamento) quando comparadas ao controle (não tratado) e host-hospedeiro, ademais, sem diferença entre variáveis ($p > 0,05$). Contrapondo, apenas na aplicação da alta dose (concentração MOI 1 - 1 bacteriófago: 1 bactéria) sendo a redução em aproximadamente 3 log de UFC/mL estatisticamente significativa.

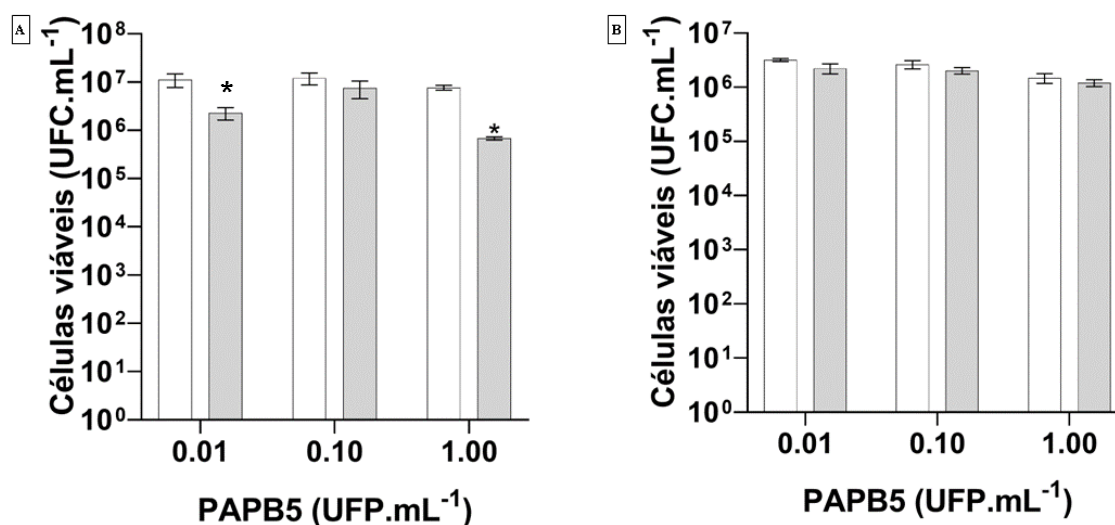
Figura 27 – Células viáveis de *Pseudomonas aeruginosa* recuperadas do biofilme aderido a superfície de elementos de titânio após tratamento com o bacteriófago **PAPB2** em diferentes concentrações.



Nota: Onde, A= Ceba ATCC® 27853™; B= Ceba clínica; Barra branca= Não tratado; Barra cinza= Tratado. 0,01 0.1 e 1 correspondem aos índices de multiplicidade de infecção viral (UFP/UFC). Os dados foram submetidos à *Two-Way* ANOVA (p -valor $< 0,05$) para comparação dos grupos amostrais tratado e não tratado. * representa diferença estatisticamente significativa entre os grupos amostrais de acordo post-hoc Tukey com aceitação de 95% ($p < 0,05$). Os dados são apresentados como médias de três experimentos independentes \pm desvios padrão. Fonte: Elaborado pela autora, 2023.

A análise do bacteriófago PAPB5 (Figura 28), apresentou diferença entre tratamento e controle na menor e maior concentração (1 log) ($p < 0,05$), ambos eventos observados apenas na cepa ATCC® 27853™. A cepa clínica não apresentou diferença entre as variáveis e nem redução de células viáveis.

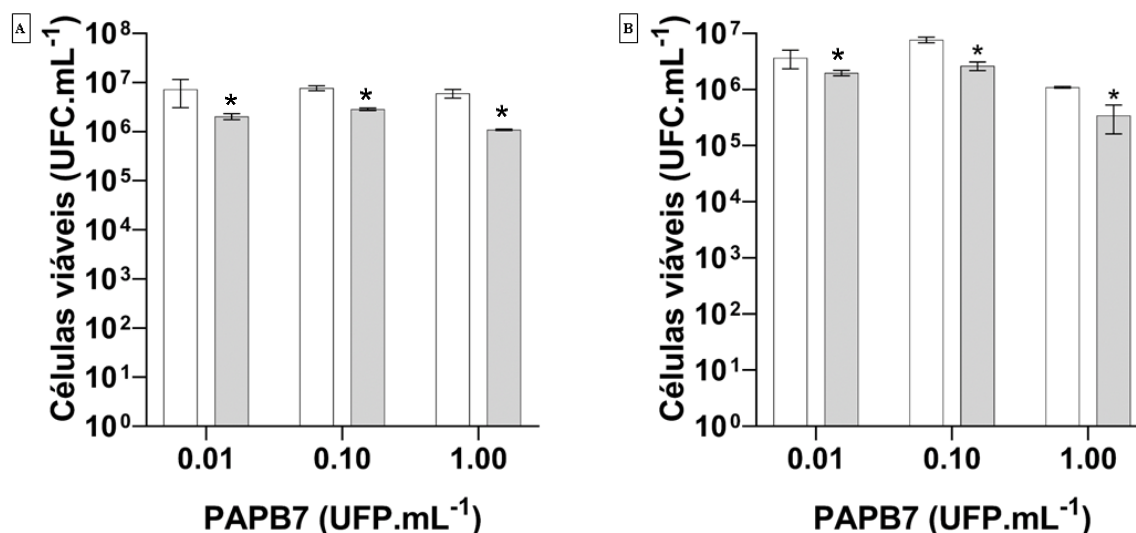
Figura 28 – Células viáveis de *Pseudomonas aeruginosa* recuperadas do biofilme maduro aderido à superfície de elementos de titânio após tratamento com o bacteriófago **PAPB5** em diferentes concentrações.



Nota: Onde, A= Cepa ATCC® 27853™; B= Cepa clínica;. Barra branca= Não tratado; Barra cinza= Tratado. 0,01 0.1 e 1 correspondem aos índices de multiplicidade de infecção viral (UFP/UFC). Os dados foram submetidos à *Two-Way* ANOVA (p -valor <0,05) para comparação dos grupos amostrais tratado e não tratado. * representa diferença estatisticamente significativa entre os grupos amostrais de acordo post-hoc Tukey com aceitação de 95% (p <0,05). Os dados são apresentados como médias de três experimentos independentes \pm desvios padrão. Fonte: Elaborado pela autora, 2023.

Considerando a ação do bacteriófago PAPB7 (Figura 29), nota-se redução no número de células viáveis para as duas cepas testadas. Fazendo-se expressivo no controle da cepa ATCC em todas as concentrações e na cepa clínica apenas, nas primeiras concentrações. Cabe ressaltar, que o efeito observado na cepa ATCC não se trata de dose-dependência, sendo exclusivamente pela presença do bacteriófago.

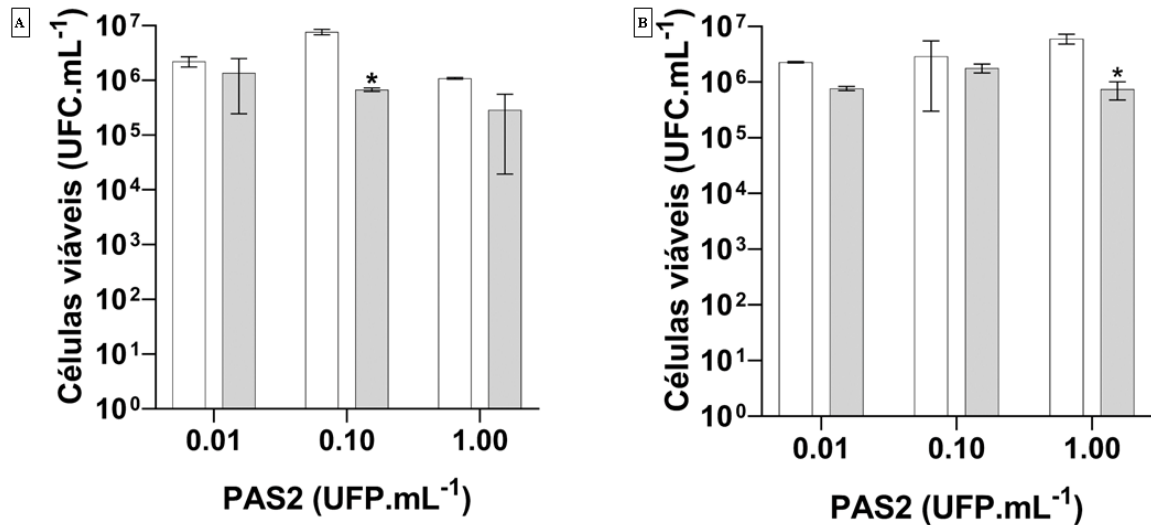
Figura 29 – Células viáveis de *Pseudomonas aeruginosa* recuperadas do biofilme maduro aderido à superfície de elementos de titânio após tratamento com o bacteriófago **PAPB7** em diferentes concentrações.



Nota: Onde, A= Cepa ATCC[®] 27853[™]; B= Cepa clínica; Barra branca= Não tratado; Barra cinza= Tratado. 0,01 0.1 e 1 correspondem aos índices de multiplicidade de infecção viral (UFP/UFC). Os dados foram submetidos à *Two-Way* ANOVA (p-valor <0,05) para comparação dos grupos amostrais tratado e não tratado. * representa diferença estatisticamente significativa entre os grupos amostrais de acordo post-hoc Tukey com aceitação de 95% (p<0,05). Os dados são apresentados como médias de três experimentos independentes \pm desvios padrão. Fonte: Elaborado pela autora, 2023.

O bacteriófago PAS2 (Figura 30), apresentou redução na concentração intermediária (MOI 0,1) para cepa ATCC, enquanto, para a cepa clínica somente na maior concentração empregada (MOI 1).

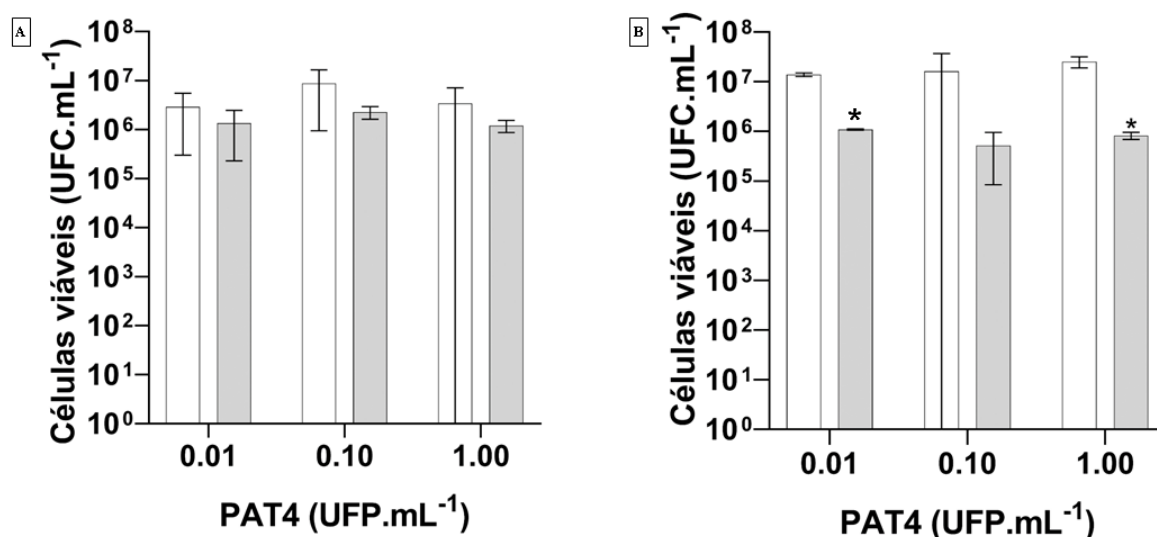
Figura 30 – Células viáveis de *Pseudomonas aeruginosa* recuperadas do biofilme maduro aderido à superfície de elementos de titânio após tratamento com o bacteriófago PAS2 em diferentes concentrações.



Nota: Onde, A= Cepa ATCC[®] 27853[™]; B= Cepa clínica; Barra branca= Não tratado; Barra cinza= Tratado. 0,01 0.1 e 1 correspondem aos índices de multiplicidade de infecção viral (UFP/UFC). Os dados foram submetidos à *Two-Way* ANOVA (p -valor <0,05) para comparação dos grupos amostrais tratado e não tratado. * representa diferença estatisticamente significativa entre os grupos amostrais de acordo post-hoc Tukey com aceitação de 95% (p <0,05). Os dados são apresentados como médias de três experimentos independentes \pm desvios padrão. Fonte: Elaborado pela autora, 2023.

Sobre a ação do bacteriófago PAT4 (Figura 31), não se pode inferir ausência de diferença na redução das células viáveis quando comparado aos controles, tendo em vista o desvio padrão. Porém, na cepa clínica foi notável nas concentrações mínima e máxima (MOI 0,01 e 1).

Figura 31 – Células viáveis de *Pseudomonas aeruginosa* recuperadas do biofilme maduro aderido à superfície de elementos de titânio após tratamento com o bacteriófago **PAT4** em diferentes concentrações.

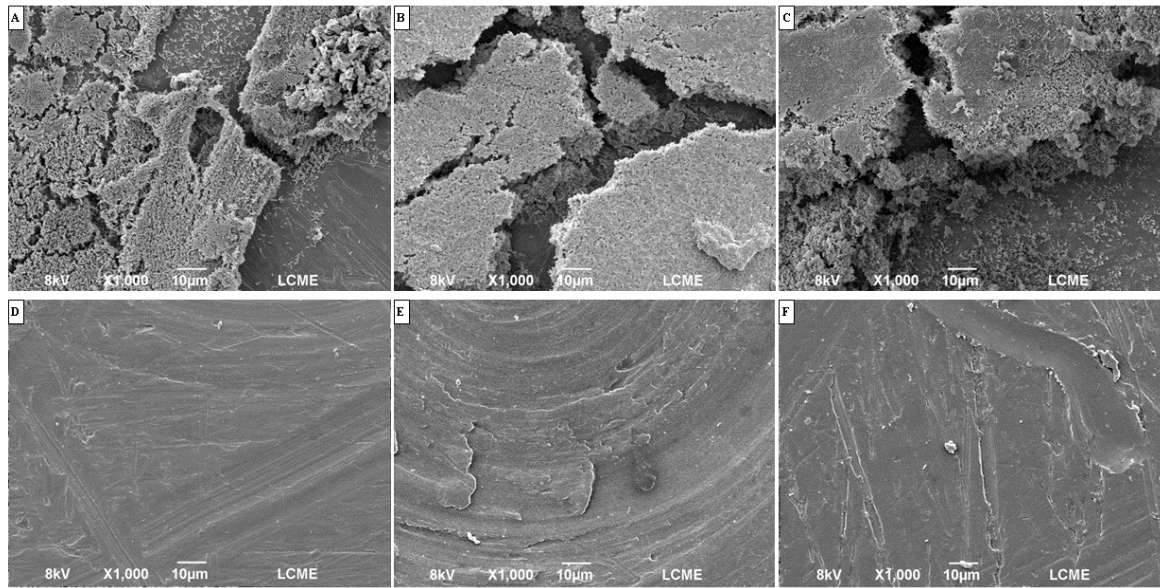


Nota: Onde, A= Cepa ATCC® 27853™; B= Cepa clínica; Barra branca= Não tratado; Barra cinza= Tratado. 0,01 0.1 e 1 correspondem aos índices de multiplicidade de infecção viral (UFP/UFC). Os dados foram submetidos à *Two-Way* ANOVA (p-valor <0,05) para comparação dos grupos amostrais tratado e não tratado. * representa diferença estatisticamente significativa entre os grupos amostrais de acordo post-hoc Tukey com aceitação de 95% (p<0,05). Os dados são apresentados como médias de três experimentos independentes ± desvios padrão. Fonte: Elaborado pela autora, 2023.

5.2.2 Avaliação qualitativa por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

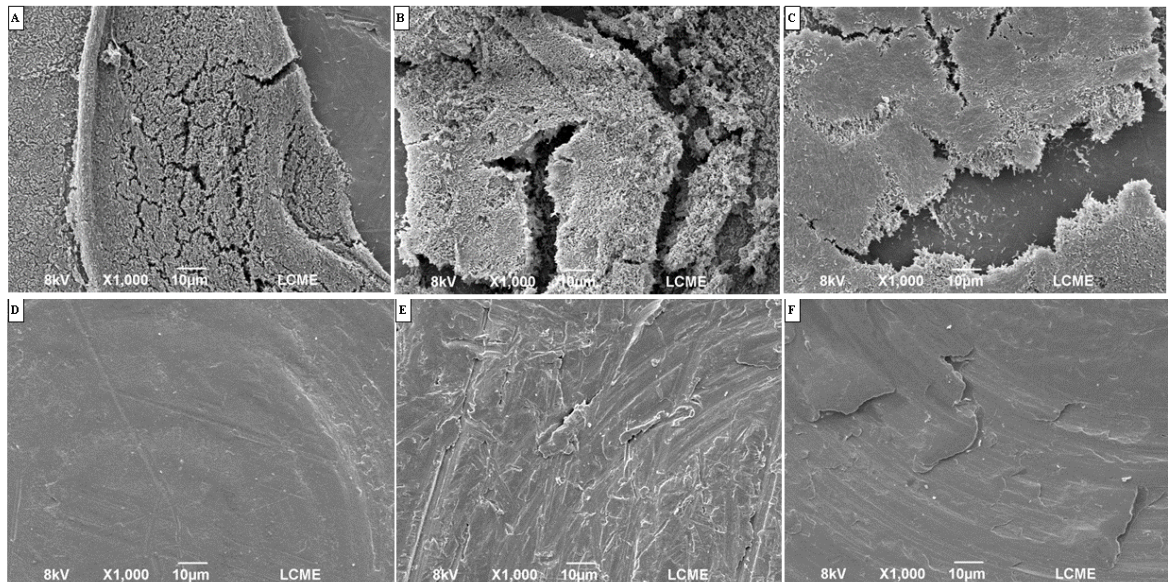
As imagens obtidas por intermédio do MEV (Figuras 32 e 33), permitem verificar o aspecto da superfície dos elementos de titânio, encobertas por biofilme de *P. aeruginosa* cepa clínica (controle positivo) e do disco sem a formação de biofilme (Controle negativo). Observa-se que a superfície do disco é bastante irregular, com visualização de suas rugosidades. Já nas imagens de controle positivo, é possível evidenciar a presença de alta densidade de biomassa celular, bem como inferir sua morfologia com formato “cogumelo” não sendo visível diferença morfológica entre biofilme produzido pelas cepas clínica e ATCC® 27853™, respectivamente.

Figura 32 – Micrografia dos controles experimentais: *Pseudomonas aeruginosa* clínica.



Nota: Onde, A, B e C = Controle positivo, biofilme bacteriano aderidos a superfície dos corpos de prova; D, E e F= Controle negativo, superfície dos discos de titânio submetido as mesmas condições de cultivo, porém sem inóculo bacteriano. Ambas as micrografias foram realizadas na mesma localização considerado a área central da superfície do corpo de prova e no tamanho de X1.000. Demais informações encontram-se na parte inferior das micrografias. Fonte: Elaborado pela autora, 2023.

Figura 33 – Micrografia dos controles experimentais: *Pseudomonas aeruginosa* ATCC® 27853™.

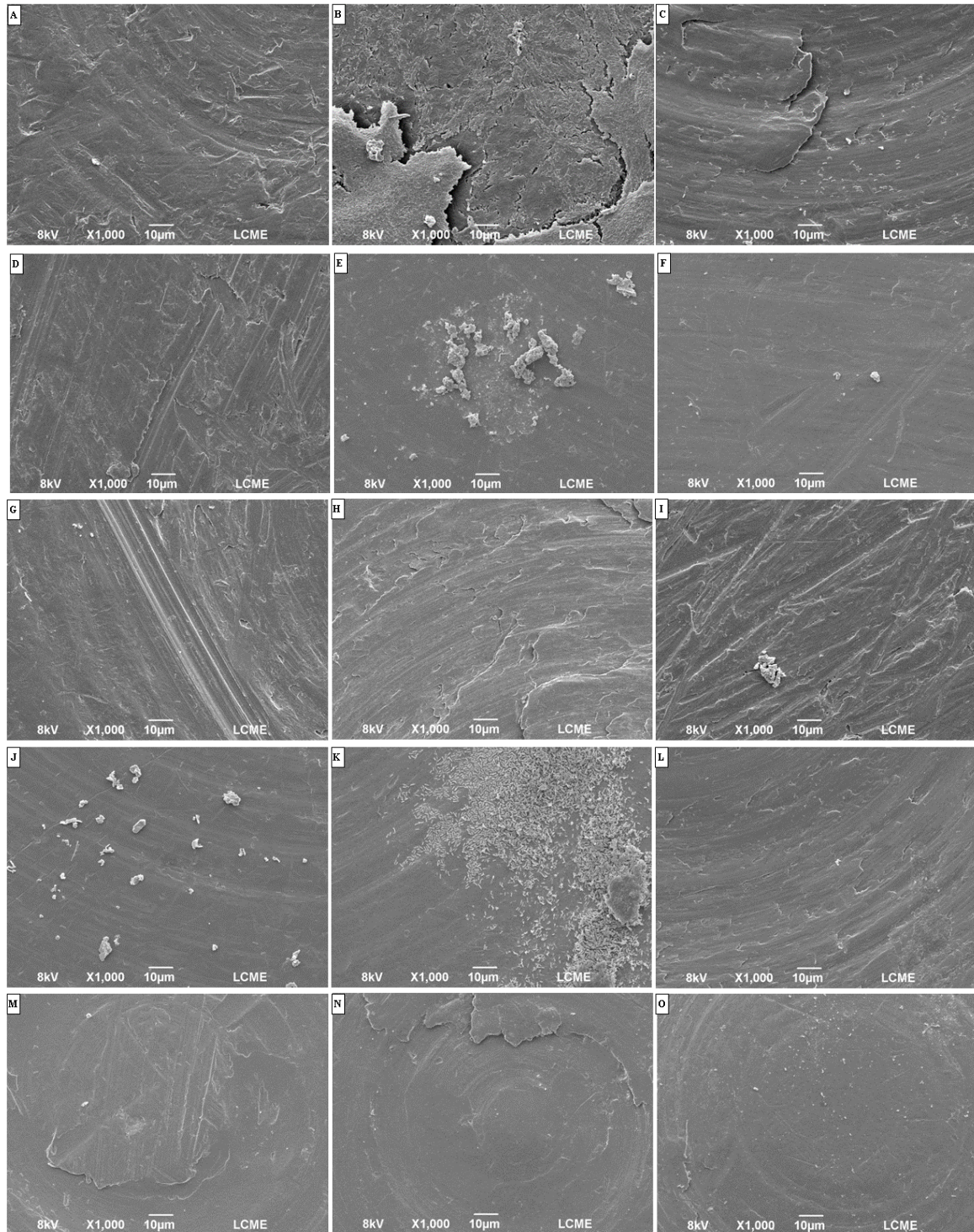


Nota: Onde, A, B e C = Controle positivo, biofilme bacteriano aderidos a superfície dos corpos de prova; D, E e F= Controle negativo, superfície dos discos de titânio submetido as mesmas condições de cultivo, porém sem inóculo bacteriano. Ambas as micrografias foram realizadas na mesma localização considerado a área central da superfície do corpo de prova e no tamanho de X1.000. Demais informações encontram-se na parte inferior das micrografias. Fonte: Elaborado pela autora, 2023.

Por meio da observação das micrografias apresentadas na figura 34, nota-se a redução do biofilme de *P. aeruginosa* cepa clínica na superfície dos elementos de titânio pós-tratamento com os 5 bacteriófagos testados, quando comparados ao controle.

No que concerne os bacteriófagos, PAT4; PAS2 e PAPB2, a dose intermediária foi menos eficiente na erradicação do biofilme quando comparada as demais concentrações aplicadas, enquanto que, dentro dos mencionados, o PAPB2 foi o menos eficiente na menor dosagem. Já o PAPB5, foi considerado o mais eficiente pois não teve presença de biofilme pós-tratamento em ambas as concentrações, assim como o PAPB7, porém, havendo resquícios de biofilme na maior concentração testada.

Figura 34 – Avaliação da atividade de desagregação e destruição do biofilme de *Pseudomonas aeruginosa* clínica em superfície de elementos de titânio, em ordem crescente de multiplicidade de infecção.

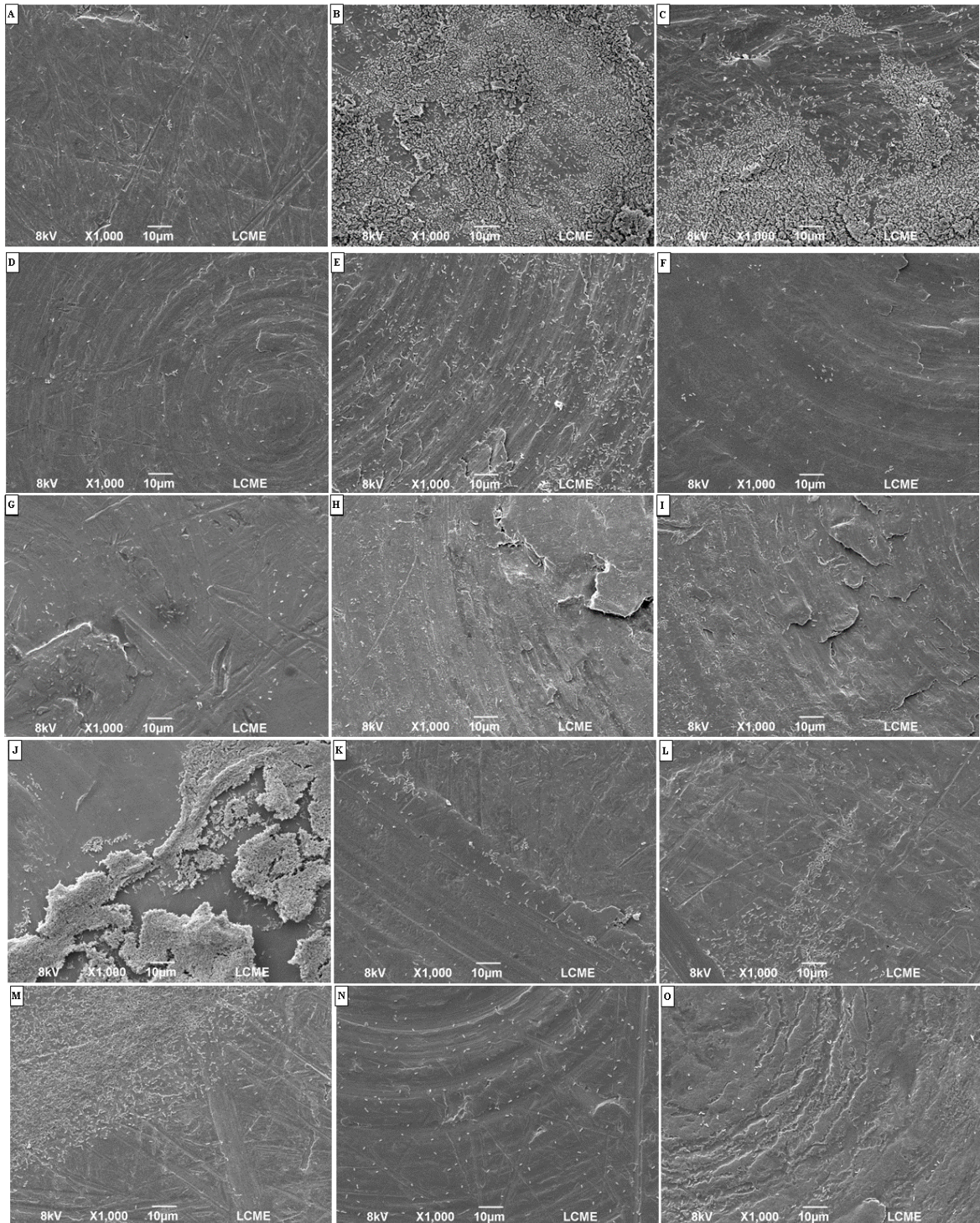


Nota: Superfície dos elementos de titânio após tratamento com bacteriófagos. Onde, as colunas correspondem a (A, D, G, J e M) = MOI 0,01; (B, E, H, K e N) = MOI 0,1 e (C, F, I, L e O) = MOI 1. Organizado por linha, sendo (A, B e C) = PAT4; (D, E e F) = PAS2; (G, H e I) = PAPB7; (J, K e L) = PAPB2 e (M, N e O) = PAPB5. Ambas as micrografias foram realizadas na mesma localização, considerado a área central da superfície do corpo de prova e no tamanho de X1.000. Demais informações encontram-se na parte inferior das micrografias. Fonte: Elaborado pela autora, 2023.

Assim, considerando a cepa ATCC, no panorama geral o mesmo foi observado quanto a capacidade de desagregação (Figura 35).

Entretanto, quanto ao perfil houve diferença, considerando a menor dose aplicada para todos os 5 fagos, o PAB2 e PAB5 tiveram a menor eficiência, sendo possível visualizar presença de biofilme e de grande densidade populacional bacteriana, respectivamente. A dose intermediária e alta foi eficiente em ambos, exceto no PAS2, mas sendo notado células plactônicas em abundância. Porém, quando comparadas, a dosagem intermediária e alta do bacteriófago PAT4, a dosagem alta foi mais eficiente. Por fim, percebeu-se que a ação dos fagos PAS2 e PAB7 foram as mais eficazes no controle de biofilme da cepa ATCC.

Figura 35 – Avaliação da atividade de desagregação e destruição do biofilme de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC® 27853™ em superfície de elementos de titânio, em ordem crescente de multiplicidade de infecção.



Nota: Superfície dos elementos de titânio após tratamento com bacteriófagos. Onde, as colunas correspondem a (A, D, G, J e M) = MOI 0,01; (B, E, H, K e N) = MOI 0,1 e (C, F, I, L e O) = MOI 1. Organizado por linha, sendo (A, B e C) = PAT4; (D, E e F) = PAS2; (G, H e I) = PAPB7; (J, K e L) = PAPB2 e (M, N e O) = PAPB5. Ambas as micrografias foram realizadas na mesma localização, considerado a área central da superfície do corpo de prova e no tamanho de X1.000. Demais informações encontram-se na parte inferior das micrografias. Fonte: Elaborado pela autora, 2023.

5.2.3 Avaliação quantitativa por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

A tabela 4, apresenta as taxas de redução do biofilme de *P. aeruginosa* por área superficial total (mm²) do corpo de prova composto por titânio.

Para a cepa ATCC, o fago PAT4 apresentou faixa de eficiência de remoção do biofilme entre 50,53 e 99,78%; PAS2, superior a 99%; PAPB, entre 71,60 e 99,16%; PAPB5, 87,55 e 99,70% e PAPB7, também superior a 99%. Considerando a cepa clínica, o PAT4 apresentou taxa de redução entre 0,01 e 99,82%; PAS2, entre 92,61 e 99,78%; PAPB2, entre 75,31 e 99,94%; PAPB5, superior a 99% e por fim, PAPB7, superior a 90%. Denota-se, portanto, eficiência na aplicação dos bacteriófagos destruição e desagregação de biofilme de *P. aeruginosa*.

Tabela 4 – Redução percentual do biofilme de *Pseudomonas aeruginosa* em superfície dos elementos de titânio por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).

<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Bacteriófago (Concentração)	Área micrografia (%)	Área biofilme disco mm ² (controle)	Área biofilme disco mm ² (tratamento)	Taxa de redução (%)
ATCC	PAT4 0,01	0,202	17,69	0,040	99,78
	PAT4 0,1	44,557		8,751	50,53
	PAT4 1	31,012		6,091	65,57
	PAS2 0,01	0,004		0,001	100,00
	PAS2 0,1	0,591		0,116	99,34
	PAS2 1	0,077		0,015	99,91
	PAPB2 0,01	25,579		5,024	71,60
	PAPB2 0,1	0,761		0,149	99,16
	PAPB2 1	3,143		0,617	96,51
	PAPB5 0,01	11,216		2,203	87,55
	PAPB5 0,1	0,563		0,111	99,37
	PAPB5 1	0,273		0,054	99,70
	PAPB7 0,01	0,147		0,029	99,84
	PAPB7 0,1	0,45		0,088	99,50
	PAPB7 1	0,162		0,032	99,82
CLÍNICA	PAT4 0,01	0,196	16,66	0,038	99,77
	PAT4 0,1	84,81		16,657	0,01
	PAT4 1	0,188		0,037	99,78
	PAS2 0,01	0,253		0,050	99,70
	PAS2 0,1	6,269		1,231	92,61
	PAS2 1	0,125		0,025	99,85
	PAPB2 0,01	2,084		0,409	97,54
	PAPB2 0,1	20,942		4,113	75,31
	PAPB2 1	0,048		0,009	99,94
	PAPB5 0,01	0,209		0,041	99,75
	PAPB5 0,1	0,104		0,020	99,88
	PAPB5 1	0,052		0,010	99,94
	PAPB7 0,01	6,859		1,347	91,91
	PAPB7 0,1	0,01		0,002	99,99
	PAPB7 1	0,188		0,037	99,78

Fonte: Elaborado pela autora, 2023. Software de edição e análise das micrográfas ImageJ[®] versão 1.49, de linguagem Java. Disponível em: < <http://rsweb.nih.gov/ij> >. Acesso em: 02 nov. 2023.

5.3 CONTROLE DE BIOFILME MEDIADO POR BACTERIÓFAGOS: PROFILAXIA

5.3.1 Contagem de células viáveis

A tabela 5, exibe a taxa de sobrevivência bacteriana após a propagação do biofilme tratamento pós-tratamento profilático para as cepas clínica e de referência. É evidente que ambos os bacteriófagos conseguiram infectar e diminuir o número de células bacterianas viáveis, atingindo taxas de erradicação superior a 97%. Portanto, os resultados não apresentaram uma relação clara com a dose administrada e variação entre o hospedeiro e o agente infeccioso, novamente, tornando difícil estabelecer uma relação de causa efeito.

Tabela 5 – Células viáveis recuperadas de biofilme de *Pseudomonas aeruginosa* em superfície de titânio pós-tratamento profilático com bacteriófagos em diferentes concentrações.

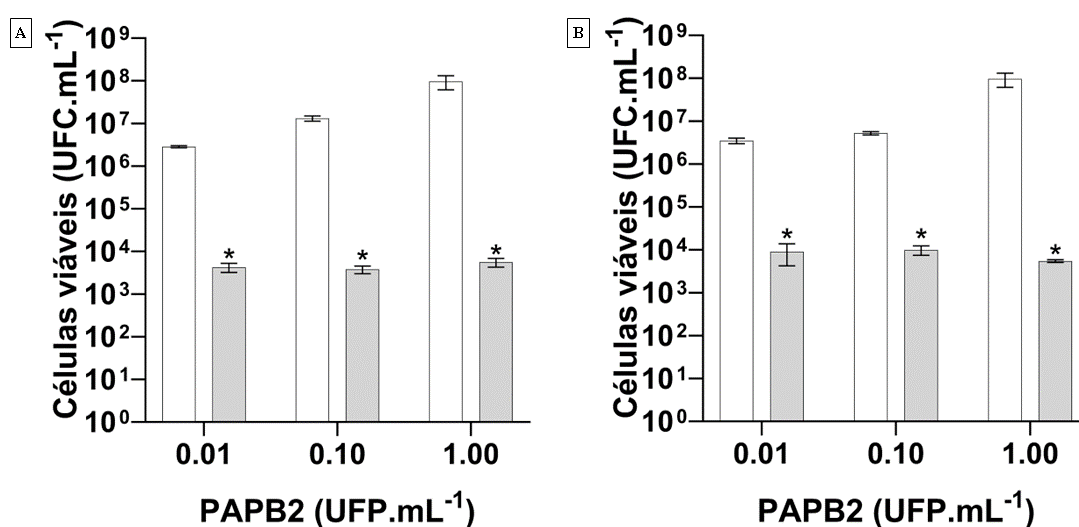
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Bacteriófagos	Concentração	Taxa de sobrevivência (%)
ATCC® 27853™	PAT4	0,01	0,19
	PAT4	0,1	0,07
	PAT4	1	0,14
	PAPB2	0,01	0,15
	PAPB2	0,1	0,52
	PAPB2	1	0,3
	PAPB5	0,01	0,09
	PAPB5	0,1	0,08
	PAPB5	1	0,61
	PAPB7	0,01	0,15
	PAPB7	0,1	0,40
	PAPB7	1	0,10
	PAS2	0,01	0,67
	PAS2	0,1	2,51
	PAS2	1	1,69
CLÍNICA	PAT4	0,01	0,05
	PAT4	0,1	0,15
	PAT4	1	0,04
	PAPB2	0,01	2,92
	PAPB2	0,1	0,41
	PAPB2	1	0,01
	PAPB5	0,01	0,23
	PAPB5	0,1	0,16
	PAPB5	1	0,26
	PAPB7	0,01	1,39
	PAPB7	0,1	0,45
	PAPB7	1	0,11
	PAS2	0,01	0,07
	PAS2	0,1	0,21
	PAS2	1	0,34

Nota: Onde, 0,01 0.1 e 1 correspondem aos índices de multiplicidade de infecção viral (UFP/UFC). UFC= Unidade Formadora de Colonias por mL; UFP= Unidade formado de placa por mL. As taxas foram calculadas considerando as médias de três experimentos independentes. Fonte: Elaborado pela autora, 2023.

As figuras a seguir, numerados de 36 a 40, representam a avaliação da redução no número de células viáveis recuperadas dos biofilmes das cepas clínica e ATCC de *P. aeruginosa*, antes e depois da aplicação profilática dos bacteriófagos PAPB2, PAPB5, PAB7, PAS2 e PPAT4, diversas concentrações.

A ação profilática evidenciada na avaliação do bacteriófago PAPB2 (Figura 36) demonstrou eficácia em ambas as variáveis, indicando que, independentemente da dose e do hospedeiro, o tratamento profilático revelou-se eficaz no controle das células viáveis após a sua aplicação ($p < 0,05$).

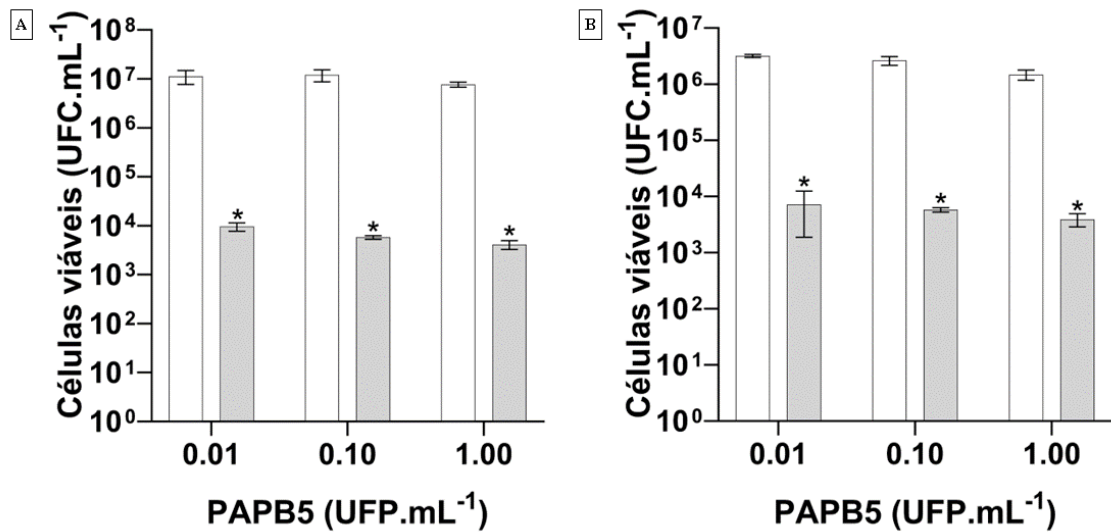
Figura 36 – Células viáveis de *Pseudomonas aeruginosa* recuperadas do biofilme antes e depois da aplicação profilática do bacteriófago **PAPB2** na superfície de elementos de titânio.



Nota: Onde, A= Cepa ATCC® 27853™; B= Cepa clínica; Barra branca= Não tratado; Barra cinza= Tratado. 0,01 0.1 e 1 correspondem aos índices de multiplicidade de infecção viral (UFP/UFC). Os dados foram submetidos à *Two-Way* ANOVA (p -valor $< 0,05$) para comparação dos grupos amostrais tratado e não tratado. * representa diferença estatisticamente significativa entre os grupos amostrais de acordo post-hoc Tukey com aceitação de 95% ($p < 0,05$). Os dados são apresentados como médias de três experimentos independentes \pm desvios padrão. Fonte: Elaborado pela autora, 2023.

No que diz respeito ao bacteriófago PAPB5 (Figura 37), foi observada uma redução notável de 3 log de UFC/mL de células viáveis em comparação com o grupo de controle sem tratamento, independentemente das variações de concentração e do hospedeiro. A significância foi atribuída exclusivamente à eficácia do tratamento em si.

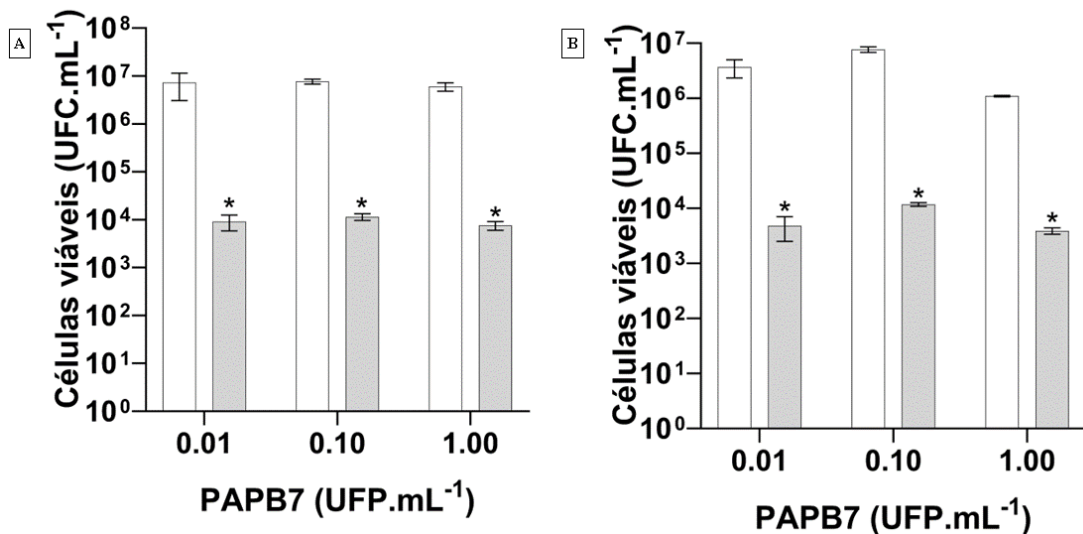
Figura 37 – Células viáveis de *Pseudomonas aeruginosa* recuperadas do biofilme antes e depois da aplicação profilática do bacteriófago **PAPB5** na superfície de elementos de titânio.



Nota: Onde, A= Cepa ATCC® 27853™; B= Cepa clínica;. Barra branca= Não tratado; Barra cinza= Tratado. 0,01 0.1 e 1 correspondem aos índices de multiplicidade de infecção viral (UFP/UFC). Os dados foram submetidos à *Two-Way* ANOVA (p-valor <0,05) para comparação dos grupos amostrais tratado e não tratado. * representa diferença estatisticamente significativa entre os grupos amostrais de acordo post-hoc Tukey com aceitação de 95% (p<0,05). Os dados são apresentados como médias de três experimentos independentes ± desvios padrão. Fonte: Elaborado pela autora, 2023.

Cenário semelhante também pode ser notado ao analisarmos o bacteriófago PAPB7 (Figura 38), o que comprova sua eficácia de maneira profilática (p<0,05).

Figura 38 – Células viáveis de *Pseudomonas aeruginosa* recuperadas do biofilme antes e depois da aplicação profilática do bacteriófago **PAPB7** na superfície de elementos de titânio.

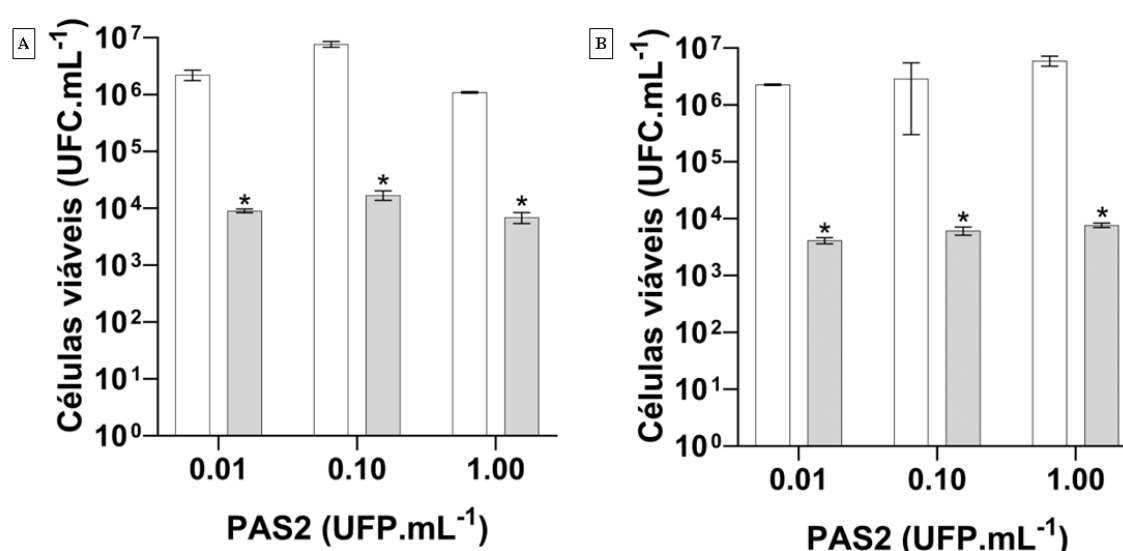


Nota: Onde, A= Cepa ATCC® 27853™; B= Cepa clínica;. Barra branca= Não tratado; Barra cinza= Tratado. 0,01 0.1 e 1 correspondem aos índices de multiplicidade de infecção viral (UFP/UFC). Os dados foram submetidos à *Two-Way* ANOVA (p-valor <0,05) para comparação dos grupos amostrais tratado e não tratado. * representa

diferença estatisticamente significativa entre os grupos amostrais de acordo post-hoc Tukey com aceitação de 95% ($p < 0,05$). Os dados são apresentados como médias de três experimentos independentes \pm desvios padrão. Fonte: Elaborado pela autora, 2023.

O bacteriófago PAS2 (Figura 39) demonstrou uma eficaz ação profilática, resultando em uma redução de cerca de ~ 2 a 3 log de UFC/mL em comparação com o grupo de controle sem tratamento ($p < 0,05$). Não se observou diferença significativa entre as diferentes concentrações, indicando a ausência de dose-dependência. Além disso, ele se mostrou capaz de reduzir o número de células viáveis em ambas as cepas, independente da concentração.

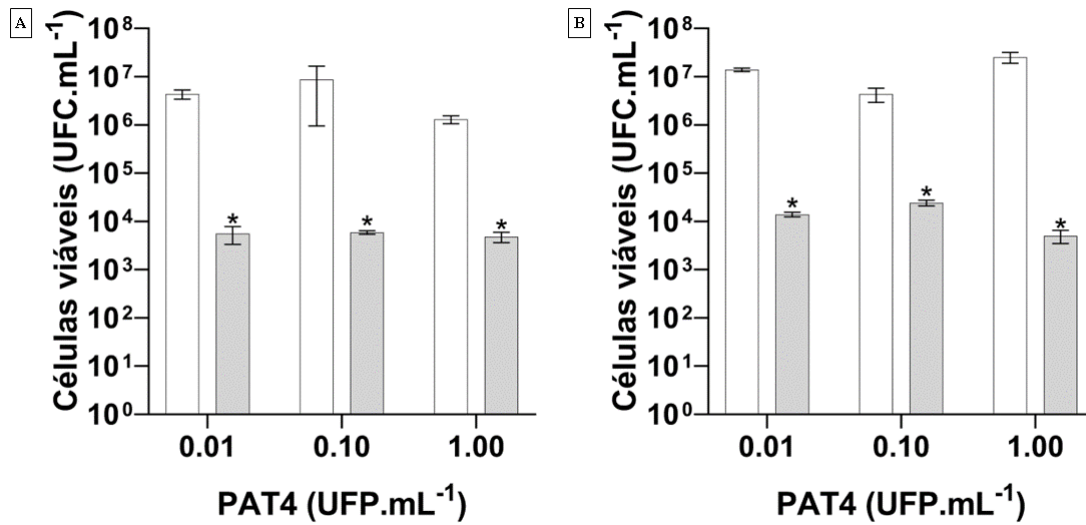
Figura 39 – Células viáveis de *Pseudomonas aeruginosa* recuperadas do biofilme antes e depois da aplicação profilática do bacteriófago PAS2 na superfície de elementos de titânio.



Nota: Onde, A= Cepas ATCC® 27853™; B= Cepas clínicas;. Barra branca= Não tratado; Barra cinza= Tratado. 0,01 0.1 e 1 correspondem aos índices de multiplicidade de infecção viral (UFP/UFC). Os dados foram submetidos à *Two-Way* ANOVA (p -valor $< 0,05$) para comparação dos grupos amostrais tratado e não tratado. * representa diferença estatisticamente significativa entre os grupos amostrais de acordo post-hoc Tukey com aceitação de 95% ($p < 0,05$). Os dados são apresentados como médias de três experimentos independentes \pm desvios padrão. Fonte: Elaborado pela autora, 2023.

O mesmo padrão também, pode ser identificado quando se considera o bacteriófago PAT4 (Figura 40), o qual resultou uma redução de aproximadamente 3 log de UFC/mL em comparação com o grupo controle sem tratamento ($p < 0,05$), sem apresentar diferenças significativas em relação às outras variáveis.

Figura 40 – Células viáveis de *Pseudomonas aeruginosa* recuperadas do biofilme antes e depois da aplicação profilática do bacteriófago **PAT4** na superfície de elementos de titânio.

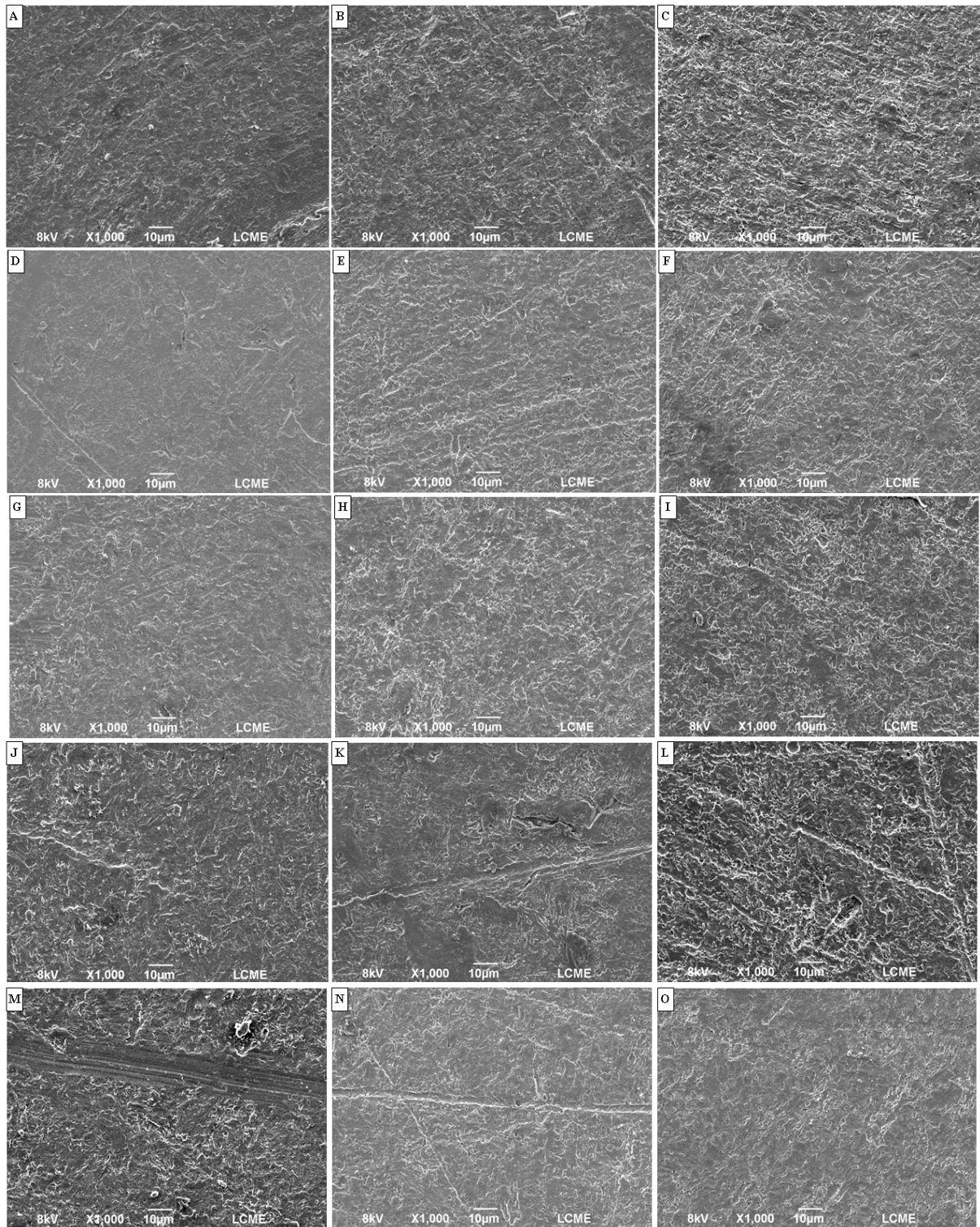


Nota: Onde, A= Cepa ATCC® 27853™; B= Cepa clínica; Barra branca= Não tratado; Barra cinza= Tratado. 0,01 0.1 e 1 correspondem aos índices de multiplicidade de infecção viral (UFP/UFC). Os dados foram submetidos à *Two-Way* ANOVA (p-valor <0,05) para comparação dos grupos amostrais tratado e não tratado. * representa diferença estatisticamente significativa entre os grupos amostrais de acordo post-hoc Tukey com aceitação de 95% (p<0,05). Os dados são apresentados como médias de três experimentos independentes ± desvios padrão. Fonte: Elaborado pela autora,

5.3.2 Avaliação qualitativa por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

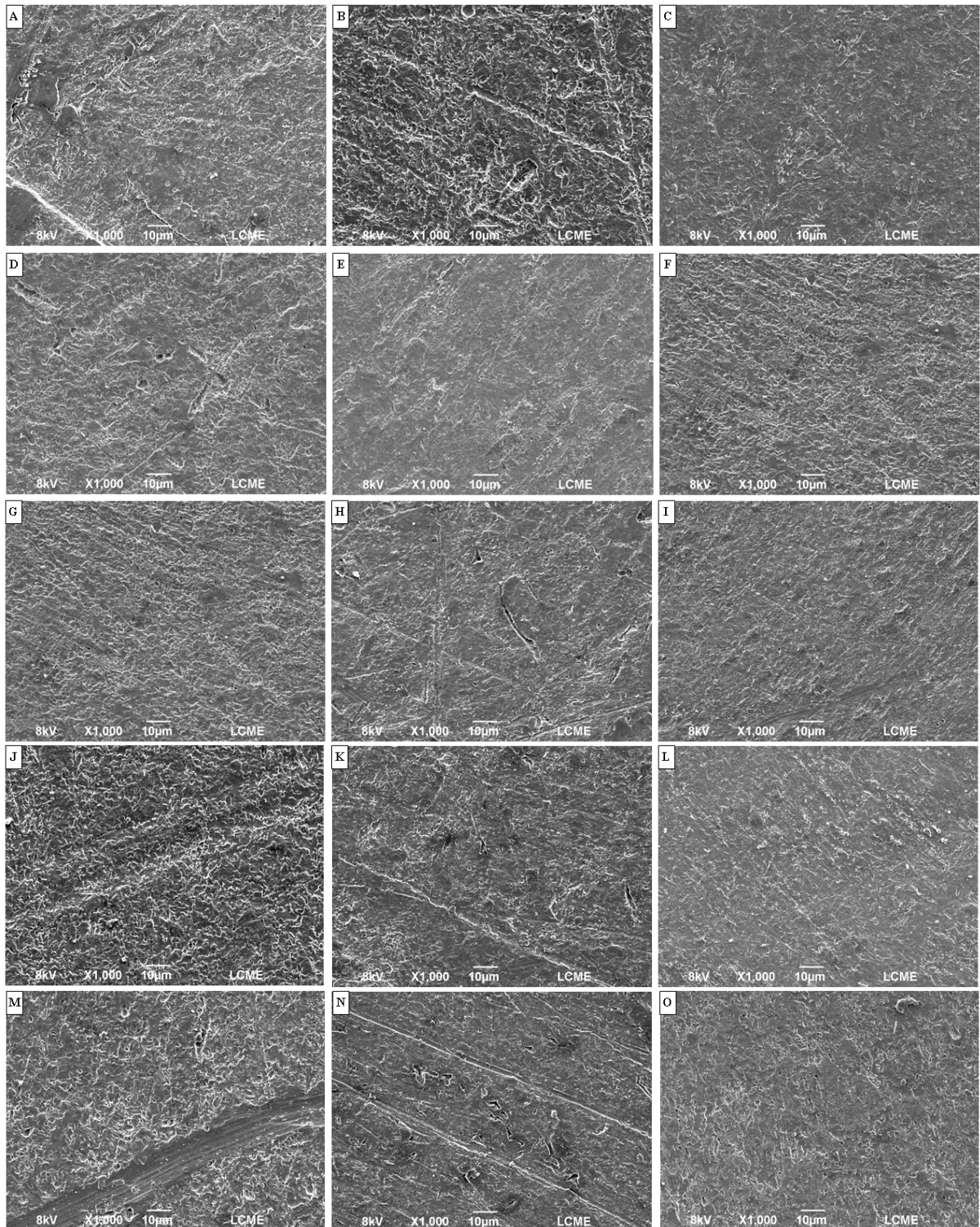
Na figura 41, é possível observar micrografias da superfície dos corpos de provas de titânio obtidas por meio da MEV, todavia, evidencia a atividade profilática com 100% da inibição da formação de biofilme na área observada, sem variação entre as variáveis de estudo (concentração e interação-patógeno-hospedeiro). O mesmo pode ser encontrado na figura 42, para os testes com a cepa clínica.

Figura 41 - Avaliação da atividade profilática de bacteriófagos na formação de biofilme de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC® 27853™ em superfície de elementos de titânio, em ordem crescente de multiplicidade de infecção.



Nota: Superfície dos elementos de titânio após tratamento com bacteriófagos. Onde, as colunas correspondem a (A, D, G, J e M) = MOI 0,01; (B, E, H, K e N) = MOI 0,1 e (C, F, I, L e O) = MOI 1. Organizado por linha, sendo (A, B e C) = PAT4; (D, E e F) = PAS2; (G, H e I) = PAPB7; (J, K e L) = PAPB2 e (M, N e O) = PAPB5. Ambas as micrografias foram realizadas na mesma localização, considerado a área central da superfície do corpo de prova e no tamanho de X1.000. Demais informações encontram-se na parte inferior das micrografias. Fonte: Elaborado pela autora, 2023.

Figura 42 - Avaliação da atividade profilática de bacteriófagos na formação de biofilme de *Pseudomonas aeruginosa* clínica em superfície de elementos de titânio, em ordem crescente de multiplicidade de infecção.



Nota: Superfície dos elementos de titânio após tratamento com bacteriófagos. Onde, as colunas correspondem a (A, D, G, J e M) = MOI 0,01; (B, E, H, K e N) = MOI 0,1 e (C, F, I, L e O) = MOI 1. Organizado por linha, sendo (A, B e C) = PAT4; (D, E e F) = PAS2; (G, H e I) = PAPB7; (J, K e L) = PAPB2 e (M, N e O) = PAPB5. Ambas as micrografias foram realizadas na mesma localização, considerado a área central da superfície do corpo de prova e no tamanho de X1.000. Demais informações encontram-se na parte inferior das micrografias. Fonte: Elaborado pela autora, 2023.

5.3.3 Avaliação quantitativa da ação profilática de bacteriófagos na formação de biofilme de *Pseudomonas aeruginosa* por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Considerando a redução percentual do biofilme de *P. aeruginosa* em superfície dos elementos de titânio por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) pós-tratamento profilático por área superficial (mm^2), observa-se eficiência de 100% em todos os fagos e concentrações utilizada. Por conseguinte, infere-se eficiência total na aplicação dos bacteriófagos para a inibição da formação de biofilme de *P. aeruginosa*.

6 DISCUSSÃO

A análise dos resultados do perfil de sensibilidade microbiana para as cepas ATCC® 27853™ e clínica de *P. aeruginosa* revela uma alta taxa de resistência a uma ampla gama de antibióticos testados, o que sugere que essas cepas são multirresistentes, um problema significativo na prática clínica atual (Santos et al., 2022).

A sensibilidade observada à Gentamicina em ambas as cepas (7,7% no caso da ATCC® 27853™ e na cepa clínica) é um resultado importante, já que a Gentamicina é um antibiótico da classe dos aminoglicosídeos comumente utilizado para tratar infecções graves por bactérias Gram-negativas, incluindo *P. aeruginosa*. No entanto, a baixa taxa de sensibilidade a esse antibiótico indica que mesmo uma opção terapêutica tradicional pode não ser eficaz em algumas cepas. A sensibilidade à Norfloxacin (7,7% na cepa ATCC® 27853™) e à Polimixina B (na cepa clínica) também merece destaque, pois a Norfloxacin é um quinolona e a Polimixina B é um antibiótico polipeptídico, geralmente utilizados para tratar infecções causadas por Gram-negativos. A sensibilidade a esses antibióticos sugere que eles podem ser opções de tratamento em casos específicos (Hussein et al., 2019).

A resistência a 92,3% dos antibióticos testados nas duas cepas indica a presença de múltiplos mecanismos de resistência, incluindo a capacidade de inativar ou evitar a ação de diferentes classes de antibióticos. Isso é particularmente preocupante, uma vez que a *P. aeruginosa* é conhecida por sua habilidade de desenvolver resistência a antibióticos com rapidez. Isso pode ser resultado da seleção de resistência devido ao uso inadequado de antibióticos, tanto em saúde humana quanto em saúde animal (Figueredo et al., 2021). Esses resultados estão em concordância com o estudo de Jacome et al., (2023), que indicam a crescente prevalência de cepas multirresistentes de *P. aeruginosa*. Dessa forma, a resistência generalizada a antibióticos pode estar associada à presença de genes de resistência adquiridos por transferência horizontal de plasmídeos ou integrons, bem como mutações genéticas (Shilpakar et al., 2019; Figueredo, 2021; Jacome et al., 2023).

Além disso, essas cepas multirresistentes podem representar um desafio clínico significativo, pois o tratamento de infecções por *P. aeruginosa* pode se tornar limitado a um número muito restrito de opções terapêuticas eficazes. Isso destaca a importância da implementação de medidas rigorosas de controle de infecções, do uso criterioso de antibióticos e do desenvolvimento de novos agentes antimicrobianos para combater eficazmente infecções causadas por *P. aeruginosa* multirresistentes (Dandachi et al., 2019).

O isolamento de bacteriófagos capazes de infectar e lisar as cepas ATCC® e clínicas de *P. aeruginosa* foi um achado importante e relevante, com potenciais implicações clínicas e terapêuticas. Assim, a capacidade dos bacteriófagos aqui referidos em infectar bactérias multirresistentes é particularmente promissora, visto que essas cepas representam um desafio significativo para o tratamento convencional com antibióticos (Santos, 2022). A observação de múltiplos perfis morfológicos em coleções multifágicas de bacteriófagos é interessante, uma vez que indica a presença de diferentes tipos de bacteriófagos com características distintas. Isso foi encontrado por Sillankorva, (2018) sugerindo uma diversidade genética entre os bacteriófagos isolados, o que pode ser benéfico em termos de eficácia na lise de diferentes cepas mais comuns envolvidas em infecções nosocomiais. (Sillankorva, 2018; Santos, 2022).

Contudo, a presença de bacteriófagos que podem lisar cepas de *P. aeruginosa* multirresistentes sugere um potencial terapêutico na aplicação de terapia com bacteriófagos. Esses bacteriófagos podem ser usados para tratar infecções que não respondem aos antibióticos convencionais, como visto no estudo de Sisakhpour et al., (2022). A presença de diferentes perfis morfológicos de bacteriófagos na coleção multifágica pode indicar uma ampla diversidade genética. Isso pode ser benéfico para abranger uma variedade de cepas de *P. aeruginosa*. Essa descoberta pode abrir caminho para o desenvolvimento de terapias de precisão, onde os bacteriófagos são escolhidos com base na cepa do paciente (Sisakhpour et al., 2022).

Todavia, Santos, (2004) demonstrou que fagos isolados de matriz clínica podem facilitar o surgimento de genes de resistência, discutindo a resistência bacteriana a bacteriófagos e os mecanismos de controle codificados pelos genomas dos bacteriófagos. O trabalho também aborda a evolução dos bacteriófagos e sua relação com as bactérias hospedeiras. Portanto, é importante monitorar a resistência e desenvolver estratégias para mitigá-la (Santos, 2004; Weck, 2012).

Em concordância com Wright et al., (2009), a descoberta de bacteriófagos eficazes contra cepas multirresistentes de *P. aeruginosa* é um campo de pesquisa em crescimento, e a evidência de sua aplicação clínica bem-sucedida tem aumentado. Estudos adicionais e ensaios clínicos são necessários para estabelecer a eficácia e a segurança dessas terapias, mas eles representam uma promissora adição ao arsenal de tratamentos contra infecções multirresistentes (Wright et al., 2009).

A observação de que tanto a cepa clínica quanto a cepa ATCC são classificadas como fortemente produtoras de biofilme está alinhada com o trabalho de Morais, (2021) que também, demonstrou a capacidade de *P. aeruginosa* de formar biofilmes robustos. Essa característica é

uma das razões pelas quais essa bactéria é uma das principais causas de infecções hospitalares crônicas (Espinoza, German, 2021). A formação de biofilme permite que as células bacterianas adiram a superfícies e se protejam de agentes antimicrobianos e do sistema imunológico, tornando as infecções mais persistentes e difíceis de tratar. Contudo a formação de biofilme por *P. aeruginosa* tem várias implicações, os biofilmes são conhecidos por conferir resistência a antibióticos, uma vez que as camadas bacterianas protegem as células do ambiente externo (Pires, 2018; Morais, 2021).

A formação de biofilme é uma preocupação significativa em dispositivos médicos, como cateteres, próteses e *stents* conforme mostra o estudo de Li et al., (2021). *P. aeruginosa* é uma das bactérias mais frequentemente associadas a infecções relacionadas a dispositivos médicos, devido à sua capacidade de formar biofilmes. Essa característica também está relacionada a infecções crônicas, como a fibrose cística, onde a *P. aeruginosa* pode colonizar as vias aéreas e formar biofilmes persistentes. Entretanto, os resultados observados, onde os bacteriófagos foram capazes de infectar e reduzir as células bacterianas viáveis, mas não erradicá-las completamente, são consistentes com muitos estudos na área de terapia com bacteriófagos, tais como, Wright et al., 2009, Fu W et al., (2010) e Waters et al., (2017), que demonstraram que o fagos tinham atividade antimicrobiana sobre *P. aeruginosa*, reduzindo o biofilme, mas sem erradicação completa de células viáveis (Wright et al., 2009; Fu W et al., 2010; Waters et al., 2017; Li et al., 2021).

A eficácia dos bacteriófagos na eliminação total de bactérias depende de vários fatores, incluindo a concentração de bacteriófagos, a especificidade do hospedeiro e a capacidade de combater as defesas bacterianas. Dessa forma, a falta de um padrão de resposta dose-dependente pode estar relacionada à saturação de receptores bacterianos nas células. À medida que a concentração de bacteriófagos aumenta, a maioria dos receptores podem já estarem ocupados, limitando o efeito adicional dos bacteriófagos. A variação na eficácia entre diferentes combinações de bacteriófagos e hospedeiros é um fenômeno comum. Isso pode ser atribuído às diferenças na interação entre o bacteriófago e as células bacterianas, bem como às adaptações bacterianas para evitar a infecção, também pode ser atribuída ao desenvolvimento de resistência bacteriana ao longo do tempo (Jorqueira; Galarce; Borie, 2015).

As bactérias podem evoluir mecanismos de defesa contra bacteriófagos, limitando sua eficácia. Em muitos casos, a terapia com bacteriófagos pode ser mais eficaz quando combinada com antibióticos ou outros tratamentos. Isso pode ajudar a superar as limitações dos bacteriófagos sozinhos. Mesmo que os resultados não tenham levado à erradicação completa, a redução significativa das células bacterianas pode ter implicações clínicas. Em algumas

infecções, a redução da carga bacteriana pode permitir que o sistema imunológico do paciente resolva o restante da infecção (Lerayer; Chopin, 1989; Ribeiro, 2016).

Isso também foi observado por Ferreira, (2022), os bacteriófagos foram capazes de reduzir, mas não erradicar completamente as células bacterianas, destacando a complexidade da terapia com bacteriófagos e a necessidade de abordagens mais refinadas. Embora os resultados não permitam uma relação causa-efeito clara, eles destacam a importância de considerar fatores como a especificidade do hospedeiro, a resistência bacteriana e a aplicação de terapias combinadas na pesquisa e no desenvolvimento de tratamentos baseados em bacteriófagos (Cunha, 2021; Ferreira, 2022).

A análise dos resultados dos gráficos referentes à redução de células viáveis no biofilme das cepas clínica e ATCC® 27853 de *P. aeruginosa* após tratamento com diferentes bacteriófagos em diferentes concentrações é complexa. Quanto ao bacteriófago PAPB2, observou-se uma redução significativa nas células viáveis na alta dose (concentração MOI 1), sugerindo que o PAPB2 é eficaz em altas concentrações. A ausência de redução significativa nas concentrações mais baixas pode indicar que a eficácia desse bacteriófago requer uma concentração crítica para a ação eficaz. Para o PAPB5, diferenças significativas entre tratamento e controle foram observadas na menor e maior concentração, apenas na cepa ATCC® 27853™, a falta de efeito na cepa clínica pode indicar diferenças na susceptibilidade do hospedeiro para esse bacteriófago (Oliveira, 2021).

O Bacteriófago PAPB7, foi eficaz na redução nas células viáveis em ambas as cepas, com destaque para a cepa ATCC em todas as concentrações. Contudo, a não observação de dose-dependência na cepa ATCC sugere que a presença do bacteriófago é suficiente para reduzir as células viáveis. A redução observada na ação do PAS2, encontra-se na concentração intermediária para a cepa ATCC e na maior concentração para a cepa clínica. Isso pode indicar que diferentes concentrações são eficazes para diferentes cepas, ressaltando a especificidade da ação dos bacteriófagos. Já para o PAT4, a presença de desvio padrão sugere resultados inconsistentes, tornando difícil inferir uma diferença significativa em relação aos controles. No entanto, na cepa clínica, houve redução notável nas concentrações mínima e máxima (Vaz; Rech; Coldebella, 2022).

Diante do exposto, é possível inferir que a variabilidade nas respostas pode estar relacionada à especificidade dos bacteriófagos para as cepas de *P. aeruginosa*. Isso é consistente no estudo de García e Porras, (2018), que demonstram que os bacteriófagos são altamente específicos para seus hospedeiros. A falta de resposta em algumas concentrações pode ser devida a vários fatores, incluindo saturação de receptores bacterianos, resistência

bacteriana ou interações complexas entre o bacteriófago e o biofilme. As diferenças na resposta entre as cepas podem ser atribuídas a variações na composição do biofilme, presença de resistência bacteriana ou até mesmo diferentes receptores bacterianos disponíveis para os bacteriófagos. Assim, a falta de dose-dependência em alguns casos sugere que a eficácia dos bacteriófagos pode depender de fatores complexos além da concentração, conforme também observado no estudo de Costa, (2010) (Costa, 2010; García; Porras, 2018).

A análise das micrografias realizadas por microscopia eletrônica de varredura (MEV) dos biofilmes de *P. aeruginosa* em discos de titânio pós-tratamento com bacteriófagos oferece informações valiosas sobre a eficácia desses bacteriófagos na redução do biofilme. Essas observações podem ser correlacionadas com estudos de Ribeiro, (2021) e Novello, (2012), que mostram a capacidade dos bacteriófagos de direcionar e reduzir biofilmes bacterianos. Dessa forma, a eficácia na redução do biofilme varia entre os bacteriófagos testados. PAPB5 e PAPB7 foram os mais eficazes, enquanto PAPB2 e PAT4 foram menos eficazes. Essa variação pode estar relacionada à especificidade do bacteriófago para as cepas específicas de *P. aeruginosa* e à capacidade de combater o biofilme (Novello, 2012; Ribeiro, 2021).

A eficácia dos bacteriófagos parece ser dose-dependente em alguns casos. Isso é evidenciado pelo menor desempenho em doses intermediárias, especialmente para PAPB2, PAPB5 e PAT4. A dose mais alta é geralmente mais eficaz na erradicação do biofilme. A observação de células planctônicas em algumas condições pode indicar que a ação dos bacteriófagos não é completa. As células planctônicas são células bacterianas livres que podem não estar contidas no biofilme. Isso sugere que os bacteriófagos podem ter dificuldade em alcançar ou eliminar essas células. Logo, diferenças nas respostas de cepas clínica e ATCC® 27853™ também são notáveis. Enquanto a eficácia geral pode ser semelhante, as concentrações e o perfil de resposta variam. Isso pode ser atribuído a diferenças nas características das cepas ou na composição dos biofilmes. A observação de resquícios de biofilme em algumas condições, mesmo após tratamento eficaz, sugere que a ação dos bacteriófagos pode não eliminar completamente todos os componentes do biofilme. Isso pode ter implicações para a recorrência de infecções (Rama; Fonseca; Blanck, 2018).

A análise das taxas de redução do biofilme de *P. aeruginosa* em discos de titânio após o tratamento com bacteriófagos fornece informações valiosas sobre a eficácia desses agentes na destruição e desagregação de biofilmes. A observação de taxas de redução do biofilme acima de 90% para a maioria dos bacteriófagos é consistente com De Costa, (2003) que demonstrou a capacidade dos bacteriófagos de efetivamente reduzir biofilmes bacterianos. Dessarte, os resultados indicam que os bacteriófagos testados são eficazes na destruição e desagregação do

biofilme de *P. aeruginosa*. Todavia, essa eficácia é crítica, uma vez que os biofilmes bacterianos são frequentemente resistentes a tratamentos convencionais (De Costa, 2003; Grando, 2021).

As taxas de redução variam entre as cepas ATCC e clínica, sugerindo que a resposta aos bacteriófagos pode ser influenciada pelas diferenças genéticas ou fenotípicas entre as cepas. Essa variação é consistente com a ideia de que a eficácia dos bacteriófagos pode ser altamente específica para a cepa bacteriana alvo. As taxas de redução também variam entre os diferentes bacteriófagos testados. Por exemplo, o bacteriófago PAPB5 demonstrou alta eficácia na maioria das condições, enquanto o PAPB2 teve uma faixa de eficiência ligeiramente menor. Essas variações podem ser atribuídas às características individuais dos bacteriófagos, como especificidade de hospedeiro e capacidade de penetração no biofilme (Veiga, 2014; Webber, 2020).

Os resultados sugerem que a terapia com bacteriófagos pode ser uma abordagem eficaz para combater infecções relacionadas a biofilmes de *P. aeruginosa*. A alta taxa de redução do biofilme é promissora do ponto de vista clínico, pois a redução do biofilme pode facilitar a ação de outros tratamentos, como antibióticos. Embora os resultados sejam promissores, também é importante considerar os desafios na aplicação clínica de terapia com bacteriófagos. Questões como a escolha apropriada de bacteriófagos, a resistência bacteriana e a logística de tratamento precisam ser estudadas (Santos, 2020; Oliveira, 2021).

A observação de que os bacteriófagos foram capazes de infectar e reduzir significativamente o número de células bacterianas viáveis, atingindo taxas de erradicação superiores a 97%, é altamente promissora no contexto da terapia com bacteriófagos. A eficácia dos bacteriófagos na erradicação das cepas clínica e de referência de *P. aeruginosa* corrobora com o estudo de Tinoco, (2017) que demonstrara a capacidade dos bacteriófagos de reduzir eficazmente as células bacterianas. A capacidade dos bacteriófagos de erradicar as cepas clínica e de referência com eficácia semelhante é uma descoberta importante. Isso sugere que os bacteriófagos têm amplo espectro e podem ser eficazes contra diferentes variantes de *P. aeruginosa* (Torres, 2016; Tinoco, 2017).

A dificuldade em estabelecer uma relação clara de causa e efeito entre a dose administrada e a erradicação pode ser atribuída à complexidade das interações bacteriófago-hospedeiro. Além disso, outros fatores, como a presença de células resistentes, podem afetar os resultados. Os resultados indicam que a terapia com bacteriófagos tem um grande potencial na eliminação de infecções por *P. aeruginosa*. A alta taxa de erradicação é promissora, especialmente em casos de infecções resistentes a antibióticos (Ortega, 2019).

A análise dos gráficos que representam a avaliação da redução no número de células viáveis em biofilmes das cepas clínica e ATCC de *P. aeruginosa* após a aplicação profilática de diferentes bacteriófagos é fundamental para entender a eficácia desses tratamentos. Portanto, a ação profilática dos bacteriófagos é claramente eficaz na redução do número de células viáveis no biofilme, independentemente da dose e do hospedeiro. Isso é evidenciado pela figura 36, que mostra uma redução significativa em todas as concentrações após o tratamento com o bacteriófago PAPB2 (Paisano, 2008).

A figura 37 destaca o impacto significativo do bacteriófago PAPB5 na redução das células viáveis, independentemente da concentração e do hospedeiro. Essa eficácia pode ser atribuída às características específicas desse bacteriófago, como a capacidade de penetrar no biofilme. A figura 38 mostra que o bacteriófago PAPB7 também é altamente eficaz na ação profilática, indicando uma redução significativa das células viáveis em todas as concentrações. Essa eficácia pode estar relacionada à capacidade desse bacteriófago de se ligar às células bacterianas no biofilme. Nas figuras 39 e 40, tanto o bacteriófago PAS2 quanto o PAT4 demonstram eficácia profilática, mas sem uma clara relação de dose-dependência. Isso sugere que, para esses bacteriófagos, a dose ótima para a ação profilática pode ser alcançada com uma concentração relativamente baixa, evitando a necessidade de doses mais altas. Isto posto, os resultados indicam que a ação profilática dos bacteriófagos pode ser uma estratégia eficaz para prevenir infecções por *P. aeruginosa*. A redução significativa no número de células viáveis é promissora, especialmente em contextos clínicos em que a prevenção é fundamental. É importante continuar a pesquisa para entender melhor as interações bacteriófago-biofilme e otimizar a aplicação desses tratamentos (Flores et al., 2010).

Além disso, estudos clínicos são necessários para avaliar a eficácia dos bacteriófagos em ambientes reais. Em síntese, os resultados destacam a eficácia dos bacteriófagos na redução de células viáveis em biofilmes de *P. aeruginosa*, especialmente quando aplicados profilaticamente, conforme observado nas taxas de 100% de inibição profilática. A ausência de dose-dependência em alguns casos sugere que o uso de concentrações relativamente baixas pode ser eficaz, o que é promissor do ponto de vista clínico. Esses resultados têm implicações importantes para o desenvolvimento de estratégias profiláticas baseadas em bacteriófagos para prevenir infecções bacterianas. A melhor ação do bacteriófago aplicado à superfície de discos de titânio para tratar biofilmes de *P. aeruginosa* na forma profilática (prevenção) em comparação com o tratamento de biofilmes maduros já estabelecidos pode ser explicada por várias teorias e fatores (Cruz; Zelli; Silva, 2022).

Algumas teorias que podem ser relevantes incluem a não adesão irreversível, ou seja, quando aplicado de forma profilática, os bacteriófagos podem interferir na produção de EPS, uma substância pegajosa secretada pelas bactérias para formar o biofilme. Isso pode dificultar a adesão e a formação do biofilme, tornando a prevenção mais eficaz do que o tratamento de biofilmes já estabelecidos, nos quais o EPS já está presente. Quando aplicados profilaticamente, os bacteriófagos podem atingir as populações bacterianas iniciais antes que elas tenham a chance de se multiplicar e formar um biofilme mais robusto. Isso pode ser mais eficaz do que tentar reduzir um biofilme estabelecido, onde as bactérias já se multiplicaram e se tornaram mais resistentes (Dias, 2014; Garcia, 2015).

Os bacteriófagos podem ser mais eficazes na penetração e destruição de biofilmes em estágios iniciais, nos quais as camadas de células bacterianas são menos densas e mais acessíveis. Nos biofilmes maduros, as camadas mais profundas podem ser mais difíceis de alcançar. Biofilmes maduros geralmente desenvolvem uma matriz extracelular densa que protege as bactérias do ambiente externo e dos agentes antimicrobianos, incluindo bacteriófagos. Essa matriz pode tornar o tratamento de biofilmes maduros mais desafiador, uma vez que os bacteriófagos podem ter dificuldade em penetrá-la. Quando os bacteriófagos são aplicados profilaticamente, as bactérias podem ser mais suscetíveis à infecção, uma vez que ainda não desenvolveram mecanismos de resistência específicos aos bacteriófagos. Nos biofilmes maduros, as bactérias podem ter tido mais tempo para desenvolver resistência (Silva, 2015; Gomes, 2016).

Nesse sentido, a aplicação profilática pode permitir um melhor controle da quantidade de bacteriófagos aplicados, reduzindo o risco de danos à superfície do titânio. Em biofilmes maduros, pode ser necessário um tratamento mais agressivo, o que pode resultar em danos à superfície.

7 SUMÁRIO DE RESULTADOS

- As cepas ATCC® 27853™ e clínica de *P. aeruginosa* apresentaram uma alta taxa de resistência a uma ampla gama de antibióticos testados, o que determina que essas cepas são multirresistentes;
- Ambas as cepas de *P. aeruginosa* foram classificadas como fortemente produtoras de biofilme;
- A escolha do titânio puro GRS4 para os corpos de prova neste estudo apresentou boa representatividade de mimetização de dispositivos biomédicos implantáveis;
- Os cinco bacteriófagos utilizados foram capazes de infectar e reduzir as células bacterianas viáveis, mas não erradicá-las completamente;
- A eficácia dos bacteriófagos na redução das células viáveis no biofilme de *P. aeruginosa* é altamente dependente da especificidade do bacteriófago, da cepa bacteriana e da concentração do tratamento;
- A análise das micrografias mostrou que os bacteriófagos são capazes de reduzir os biofilmes de *P. aeruginosa* em discos de titânio com taxas superiores a 90%;
- Quando usados profilaticamente os bacteriófagos inibiram 100% da formação do biofilme;
- Os resultados destacam a eficácia dos bacteriófagos na redução de células viáveis em biofilmes de *P. aeruginosa*, especialmente quando aplicados profilaticamente.

8 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos nesta pesquisa revelam a notável eficácia dos bacteriófagos na redução de biofilmes de *P. aeruginosa* em superfície de titânio, oferecendo uma perspectiva promissora para sua aplicação em dispositivos biomédicos implantáveis. A multirresistência observada nas cepas testadas, destaca a urgência de desenvolvimento de alternativas terapêuticas, e os bacteriófagos emergem como agentes capazes de enfrentar esse desafio, especialmente diante da sua capacidade de reduzir significativamente as células viáveis nos biofilmes. A especificidade do bacteriófago, a cepa bacteriana e a concentração do tratamento despontam como fatores críticos, influenciando a eficácia da redução. A análise microscópica comprova a efetividade dos bacteriófagos, destacando redução superior a 90% no que corresponde ao tratamento de biofilmes, quanto que, 100% na inibição da formação de biofilmes quando usados de forma profilática. Em conjunto, estes achados proporcionam *insights* cruciais para o desenvolvimento futuro de estratégias terapêuticas baseadas no uso da fagoterapia, sinalizando avanços notáveis no combate às infecções associadas a biofilmes bacterianos em implantes biomédicos e no desenvolvimento de produtos baseado na atividade de bacteriófagos.

9 POTENCIALIDADES E LIMITAÇÕES

9.1 POTENCIALIDADES

- O estudo demonstra o potencial dos bacteriófagos como um potencial terapêutico para reduzir biofilmes de *P. aeruginosa* em elementos de titânio. Isso é relevante, considerando a crescente preocupações com infecções relacionadas a biofilmes em dispositivos biomédicos;
- Destaca-se a eficácia da ação profilática dos bacteriófagos na prevenção da formação de biofilmes. Essa abordagem pode ser valiosa na prevenção de infecções em dispositivos médicos antes que os biofilmes se estabeleçam;
- O trabalho investiga a aplicação de bacteriófagos em elementos de titânio, que são amplamente utilizados em dispositivos médicos, como implantes e próteses. Isso amplia a relevância do estudo para várias áreas da biomedicina;
- O uso de bacteriófagos oferece uma alternativa ao tratamento de infecções resistentes a antibióticos, o que é uma preocupação global crescente. Essa pesquisa contribui para a busca de soluções para esse desafio.

9.2 LIMITAÇÕES

- Complexidade das interações: O estudo reconhece a complexidade das interações entre bacteriófagos e biofilmes. Essa complexidade pode dificultar a revisão dos resultados em diferentes contextos clínicos;
- Estabilização dos bacteriófagos: Os bacteriófagos são vírus que infectam bactérias e, como outros organismos, podem exibir variabilidade genética. Isso significa que diferentes amostras de um mesmo tipo de bacteriófago podem ter propriedades ligeiramente diferentes, o que torna difícil garantir que os resultados sejam sempre os mesmos.
- Necessidade de pesquisa clínica: A dissertação fornece uma base para pesquisas futuras, mas estudos clínicos em ambientes reais são necessários para avaliar plenamente a eficácia e segurança dessa abordagem;
- Variação entre host-hospedeiro: A pesquisa destaca a variação na eficácia entre diferentes cepas de *P. aeruginosa* e bacteriófagos. Isso ressalta a necessidade de uma abordagem personalizada para o tratamento.

10 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Em resumo, este trabalho apresenta uma abordagem promissora para lidar com infecções relacionadas a biofilmes em dispositivos biomédicos, em especial, compostos por titânio. No entanto, contribui-se para o avanço da terapia com bacteriófagos embora reconheça a necessidade de pesquisa clínica adicional e consideração das complexas interações envolvidas.

Com base nos resultados aqui referidos, sobre a redução de biofilmes de *P. aeruginosa* mediada por bacteriófagos em elementos de titânio, para futuros estudos, sugere-se:

- Estudos clínicos controlados: Realizar estudos clínicos controlados em pacientes que receberam dispositivos médicos de titânio com aplicação profilática de bacteriófagos. Isso ajudaria a avaliar a eficácia e segurança da abordagem em um ambiente clínico real;
- Avaliação de outros biomateriais: Expandir a pesquisa para avaliar a eficácia dos bacteriófagos em reduzir biofilmes em diferentes biomateriais usados em dispositivos médicos. Isso permitiria adaptar a terapia a uma variedade de materiais;
- Estudos de mecanismos de ação: Investigar mais a fundo os mecanismos pelos quais os bacteriófagos reduzem os biofilmes bacterianos. Isso poderia ajudar a otimizar a terapia e melhorar a compreensão das interações bacteriófago-bactéria;
- Desenvolvimento de formas de entrega: Explorar diferentes métodos de entrega de bacteriófagos em dispositivos médicos, garantindo que eles possam ser aplicados de maneira eficaz e segura;
- Resistência e Coevolução: Estudar a possibilidade de desenvolvimento de resistência bacteriana aos bacteriófagos e como a coevolução entre os dois afeta a eficácia da terapia. Isso é importante para evitar a evolução de cepas resistentes;
- Investigar a combinação de terapia com bacteriófagos e antibióticos para abordar infecções resistentes a antibióticos. Essa combinação pode potencializar a eficácia da terapia;
- Segurança e regulamentação: Realizar pesquisas adicionais sobre a segurança e aplicação de bacteriófagos em dispositivos médicos e abordar questões regulatórias relacionadas ao uso desses agentes na medicina;
- Personalização da terapia: Desenvolver abordagens personalizadas com base na cepa bacteriana e no tipo de biofilme, garantindo que a terapia seja adaptada às características específicas da infecção;

- Aplicações em outros contextos: Explorar a aplicação de terapias com bacteriófagos em outros contextos além de dispositivos médicos, como na indústria alimentícia e na descontaminação de ambientes hospitalares.

11 PARTICIPAÇÕES EM EVENTOS E PUBLICAÇÕES

O período de mestrado é uma fase crucial na formação acadêmica e profissional, proporcionando experiências enriquecedoras e oportunidades de contribuir para o avanço do conhecimento científico. Este tópico tem como objetivo relatar as atividades e participações durante o curso de mestrado, destacando eventos, publicações e contribuições para a área da biotecnologia e biociências.

- **Escrita de artigos científicos de revisão:** Durante o mestrado, uma das contribuições foi a escrita de artigos científicos que abordaram as aplicações biotecnológicas de bacteriófagos de forma geral e, aplicação de bacteriófagos em biofilmes bacterianos em dispositivos médicos implantáveis;
- **Capítulos de livros:** Participei da escrita de capítulos de livros que abordaram a presença de vírus no ambiente sob a perspectiva da Saúde Única, bioprospecção de bacteriófagos suas interações na resistência bacteriana e no controle microbiano e os impactos dos vírus na fermentação de alimentos;
- **Coorientação de trabalho de conclusão de curso:** Realizei a coorientação de trabalho de conclusão de curso da graduação em Ciências Biológicas, que se propôs a estudar bacteriófagos associados a antibióticos visando o controle *in vitro* de *P. aeruginosa*;
- **Participação em eventos e congressos:** Participei ativamente na organização do primeiro curso de inverno do Programa de Pós-graduação em Biotecnologia e Biociências, me propiciando uma experiência de ensino e aprendizado. Além disso, apresentei trabalhos no Congresso Brasileiro de Virologia (2022 e 2023) e no Congresso Brasileiro de Microbiologia (2023), demonstrando a disseminação do conhecimento adquirido. Bem como, atuei na organização e apresentação do Laboratório de Virologia Aplicada na Semana de Ensino, Pesquisa, Extensão e Inovação (2022 e 2023);
- **Formação complementar e supervisão de alunos:** Durante o desenvolvimento do mestrado, tive a oportunidade da formação em auditoria e implementação da ISO 9001 no LVA. Além disso, contribuí para a formação de alunos do curso de odontologia, oferecendo supervisão e auxílio em trabalhos relacionados a biofilmes multiespécie.

REFERÊNCIAS

ABEDON, Stephen T. Phage-antibiotic combination treatments: Antagonistic impacts of antibiotics on the pharmacodynamics of phage therapy?. **Antibiotics**, v. 8, n. 4, p. 182, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.3390/antibiotics8040182>>. Acesso em: 20 out. 2023.

ADAMS, M. H. Bacteriophages. Bacteriophages, 1959. ADRIAENSSENS, E. M.; RODNEY BRISTER, J. How to Name and Classify Your Phage: An Informal Guide. *Viruses*, v. 9, n. 4, 3 abr. 2017. Disponível em: doi: 10.3390/v9040070 . Acesso em: 8 jun. 2023.

ALEXANDROVA, M. B.; ZHIVAGO, N. L.; ALEKSEEVA, L. N.; ZEITLENOK, N. A. Phage therapy against dysentery. *J. Microbiol. Epidemiol. Immunol*, v. 1, p. 860–868, 1935 Disponível em: <doi: 10.4292/wjgpt.v8.i3.162>. Acesso em: 20 out. 2023.

ALHEDE, Maria et al. The origin of extracellular DNA in bacterial biofilm infections in vivo. **Pathogens and Disease**, v. 78, n. 2, p. ftaa018, 2020. Disponível em: <doi: 10.1093/fmspd>. Acesso em: 03 ago. 2023.

ALVES, Maria José et al. Biofilme bacteriano e infecção hospitalar. **Saúde: Conexões e Sustentabilidade para o Entendimento Global**, p. 110-122, 2016. Disponível em: <<http://hdl.handle.net/10198/17400>>. Acesso em: 02 nov. 2023.

AMAN, Bogdan; CIOBANU, Gabriel. Mutual mobile membranes with objects on surface. **Natural Computing**, v. 10, p. 777-793, 2011. Disponível em: <<https://link.springer.com/article/10.1007/s11047-011-9249-x>>. Acesso em: 02 out. 2023.

ARAÚJO, Paulo Monteiro et al. Resistência a antimicrobianos e sua correlação estatística com o consumo em hospitais: Uma revisão integrativa da literatura. **Research, Society and Development**, v. 11, n. 1, p. e55611124058-e55611124058, 2022. Disponível em: <<https://rsdjournal.org/index.php/rsd/article/view/24058>>. Acesso em: 04 nov. 2023.

ARDITA, Courtney S. et al. Epithelial adhesion mediated by pilin SpaC is required for *Lactobacillus rhamnosus* GG-induced cellular responses. **Applied and environmental microbiology**, v. 80, n. 16, p. 5068-5077, 2014. Disponível em: <<https://doi.org/10.1128/AEM.01039-14>>. Acesso em: 15 out. 2023.

ARIAS, Sandra L.; BRITO, Ilana L. Biophysical determinants of biofilm formation in the gut. **Current opinion in biomedical engineering**, v. 18, p. 100275, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.cobme.2021.100275>>. Acesso em: 07 out. 2023.

ARRUDA, C. J. M. de A.; SIQUEIRA, V. F. de A.; SOUZA, F. J. M. de; SILVA, J. L. das N.; SANTOS, K. F. dos; CIPRIANO, D. Z. C.; DIAS, L. A. de S. D.; FARO, F. R. A. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA DE ANTIBIÓTICOS BETA-LACTÂMICOS. 2019. Disponível em: https://portal.unisepe.com.br/unifia/wp-content/uploads/sites/10001/2019/10/085_Revis%C3%A3o-bibliogr%C3%A1fica-de-antibi%C3%B3ticos-beta-lact%C3%A2micos-982-a-995.pdf . Acesso em: 8 jun. 2023.

Associação de Gastroenterologia do Estado do Rio de Janeiro (AGRI), 2017. Patógenos prioritários. Disponível em: <<https://www.paho.org/pt/noticias/27-2-2017-oms-publica-lista-bacterias-para-quais-se-necessitam-novos-antibioticos>>. Acesso em: 07 out. 2023.

AVELINO, Fabiola et al. The majority of enteroaggregative *Escherichia coli* strains produce the *E. coli* common pilus when adhering to cultured epithelial cells. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 300, n. 7, p. 440-448, 2010. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2010.02.002>>. Acesso em: 19 ago. 2023.

BAI, J.; KIM, Y. T.; RYU, S.; LEE, J. H. Biocontrol and rapid detection of food-borne pathogens using bacteriophages and endolysins. *Frontiers in Microbiology*, v. 7, n. APR, p. 189888, 8 abr. 2016. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00474> . Acesso em: 11 jun. 2023.

BARBOSA, Johnny Dias et al. Fagoterapia como alternativa às Infecções Bacterianas. 2022. Disponível em: <<https://repositorio.animaeducacao.com.br/handle/ANIMA/31834>>. Acesso em: 03 ago. 2023.

BARCELOS, Aline Fernandes et al. Atividade de nanopartículas Fe₃O₄/Ag na formação de biofilme por *Pseudomonas aeruginosa*. 2022. Disponível em: <<https://www.btdt.ueg.br/handle/tede/1317>>. Acesso em: 15 out. 2023.

Beitelshees M, Hill A, Jones CH, Pfeifer BA. Phenotypic Variation during Biofilm Formation: Implications for Anti-Biofilm Therapeutic Design. *Materials*. 2018; 11(7):1086. Disponível em: <<https://doi.org/10.3390/ma11071086>>. Acesso em: 15 out. 2023.

BODEY, Gerald P. et al. Infecções causadas por *Pseudomonas aeruginosa*. **Resenhas de doenças infecciosas**, v. 5, n. 2, pág. 279-313, 1983. Disponível em: <<https://doi.org/10.1093/clinids/5.2.279>>. Acesso em: 02 out. 2023.

BOLÍVAR-VARGAS, Andrés Felipe; TORRES-CAYCEDO, María Inés; SÁNCHEZ-NEIRA, Yaline. Biofilms de *Pseudomonas aeruginosa* como mecanismos de resistencia y tolerancia a antibióticos. Revisión narrativa. **Revista de la Facultad de Ciencias de la Salud Universidad del Cauca**, v. 23, n. 2, p. 47-57, 2021. Disponível em: <<https://revistas.unicauca.edu.co/index.php/rfcs/article/view/1780>>. Acesso em: 27 ago. 2023.

BURMOLLE, M. et al. Biofilms in chronic infections - a matter of opportunity - mono-species biofilms in multispecies infections. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, v. 59, p. 324-36, 2010. Disponível em: <[doi: 10.1111/j.1574-695X.2010.00714.x](https://doi.org/10.1111/j.1574-695X.2010.00714.x)>. Acesso em: 18 out. 2023.

CAIXETA, D. S. Sanificantes químicos no controle de biofilmes formados por duas espécies de *Pseudomonas* em superfície de aço inoxidável. Dissertação de Mestrado – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2008. Disponível em: <<http://repositorio.ufla.br/jspui/handle/1/2267>>. Acesso em: 03 set. 2023.

CAMACHO, Saul Dresjan et al. Infecção do trato urinário: aspectos epidemiológicos, fisiopatológicos e manejo terapêutico. **Brazilian Journal of Development**, v. 9, n. 4, p. 12721-12730, 2023. Disponível em: <<https://doi.org/10.34117/bjdv9n4-013>>. Acesso em: 02 nov. 2023.

CAMILO, José R.; MASET, Angelo L.; ROLLO, João MDA. Biomateriais aplicados em derivação ventrículo-peritoneal. In: **XII Congresso Latino Americano de Órgãos Artificiais e Biomateriais**. 2012. Disponível em: <<https://www.researchgate.net/profile/Angelo->

Maset/publication/330181675_BIOMATERIAIS_APLICADOS_EM_DERIVACAO_VENTRICULO-PERITONEAL/links/5ca9677c4585157bd3287692/BIOMATERIAIS-APLICADOS-EM-DERIVACAO-VENTRICULO-PERITONEAL.pdf>. Acesso em: 15 out. 2023.

CHEN, Q.; DHARMARAJ, T.; CAI, P. C.; BURGNER, E. B.; HADDOCK, N. L.; SPAKOWITZ, A. J.; BOLLYKY, P. L. Bacteriophage and Bacterial Susceptibility, Resistance, and Tolerance to Antibiotics. *Pharmaceutics*, v. 14, n. 7, 1 jul. 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14071425>. Acesso em: 8 nov. 2023.

CAPELLETTI, R. V. Avaliação da atividade de biocidas em biofilmes formados a partir de fluido de corte utilizado na usinagem de metais. Dissertação de Mestrado, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2006. Disponível em: <<http://libdigi.unicamp.br/document/?code=vtls000392545>>. Acesso em: 10 ago. 2023.

COSTA, Kátia Gonçalves et al. Transmissão de *Acinetobacter baumannii* resistente em uma unidade de terapia intensiva: abordagem do ambiente e da higiene das mãos através de um modelo matemático determinístico. 2010. Tese de Doutorado. Disponível em: <<https://www.arca.fiocruz.br/handle/icict/24216>>. Acesso em: 10 ago. 2023.

COSTERTON, J. William; STEWART, Philip S.; GREENBERG, E. Peter. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *science*, v. 284, n. 5418, p. 1318-1322, 1999. Disponível em: <<https://www.science.org/doi/abs/10.1126/science.284.5418.1318>>. Acesso em: 13 set. 2023.

CUNHA, Paloma Cavalcante. Proposição de um coquetel fágico para controle de biofilmes de bactérias redutoras de sulfato em ambientes relacionados à indústria de óleo e gás. 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.47328/ufvbbt.2021.170>>. Acesso em: 03 nov. 2023.

DA COSTA LIMA, Jailton Lobo et al. ANÁLISE DA RESPOSTA DE PSEUDOMONAS AERUGINOSA RESISTENTE AOS CARBAPENÊMICOS CONTRA MONOTERAPIA E TERAPIA COMBINADA USANDO PONTOS QUÂNTICOS E PROTEÔMICA. *The Brazilian Journal of Infectious Diseases*, v. 26, p. 101728, 2022. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.bjid.2021.101728>>. Acesso em: 10 ago. 2023.

DA SILVA TRENTIN, Danielle; GIORDANI, Raquel Brandt; MACEDO, Alexandre José. Biofilmes bacterianos patogênicos: aspectos gerais, importância clínica e estratégias de combate. *Revista Liberato*, v. 14, n. 22, p. 213-236, 2013. Disponível em: <<https://revista.liberato.com.br/index.php/revista/article/view/229>>. Acesso em: 27 ago. 2023.

DANDACHI, Iman et al. Understanding the epidemiology of multi-drug resistant gram-negative bacilli in the Middle East using a one health approach. *Frontiers in microbiology*, v. 10, p. 1941, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01941>>. Acesso em: 01 nov. 2023.

DAVIES, D.G. et al. The involvement of cell-to-cell signals in the development of a bacterial biofilm. *Science*, v. 280, p. 295-298, 1998. Disponível em: <DOI: 10.1126/science.280.5361.295>. Acesso em: 27 ago. 2023.

DE COSTA LUNA, Luciana et al. Eficiência de Wetlands construídos com dez dias de detenção hidráulica na remoção de colífagos e bacteriófagos. **Revista de biologia e ciências da terra**, v. 3, n. 1, p. 0, 2003. Disponível em: <<https://www.redalyc.org/pdf/500/50000302.pdf>>. Acesso em: 22 ago. 2023.

DELPHITO, Leonardo. **Estudos bioquímicos e biofísicos das proteínas PA0575 e PA0285, componentes das vias de sinalização do c-di-GMP em Pseudomonas aeruginosa**. 2020. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo. Disponível em: <<https://doi.org/10.11606/D.76.2020.tde-25082021-081412>>. Acesso em: 15 out. 2023.

DIAS, Roberto Sousa. Controle de biofilmes em membranas de osmose inversa através de bacteriófagos. 2014. Disponível em: <<http://locus.ufv.br/handle/123456789/281>>. Acesso em: 27 ago. 2023.

DIGGLE, Stephen P.; WHITELEY, Marvin. Perfil Micróbio: Pseudomonas aeruginosa: patógeno oportunista e rato de laboratório. **Microbiologia**, v. 166, n. 1, pág. 30, 2020. Disponível em: <[doi: 10.1099/mic.0.000860](https://doi.org/10.1099/mic.0.000860)>. Acesso em: 07 out. 2023.

DONLAN, R.M.; COSTERTON, J.W. Bio-films: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clinical Microbiology Reviews*, v. 15, p.167-193, 2002. Disponível em: <[DOI: 10.1128/CMR.15.2.167-193.2002](https://doi.org/10.1128/CMR.15.2.167-193.2002)>. Acesso em: 01 set. 2023.

DUNNE JR., W.M. Bacterial adhesion: seen any good biofilms lately? *Clinical Microbiology Reviews*, v.15, p. 155-166, 2002. Disponível em: <<https://doi.org/10.1128/cmr.15.2.155-166.2002>>. Acesso em: 19 ago. 2023.

EMÍDIO, Elúzia Castro Peres et al. Estudo da interação entre três diferentes reinos: entendendo a complexidade de co-infecções entre bactérias e o fungo *Cryptococcus gattii* em modelo murino. 2020. Disponível em: <<https://repositorio.ufmg.br/handle/1843/36659>>. Acesso em: 03 set. 2023.

ESPINOZA PESANTEZ, Diana Isabel; ESPARZA SANCHEZ, German Francisco. Resistencia enzimática en *Pseudomonas aeruginosa*, aspectos clínicos y de laboratorio. *Revista chilena de infectología*, v. 38, n. 1, p. 69-80, 2021. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.4067/S0716-10182021000100069>>. Acesso em: 27 ago. 2023.

FERREIRA, Bárbara Sofia Bucha. **O potencial terapêutico dos bacteriófagos e as infecções nosocomiais**. 2022. Tese de Doutorado. Disponível em: <<http://hdl.handle.net/10451/57887>>. Acesso em: 18 ago. 2023.

FIGUEREDO, Ana Catarina Fernandes et al. *Pseudomonas aeruginosa*: panorama do perfil de resistência aos carbapenêmicos no Brasil. **Brazilian Journal of Development**, v. 7, n. 1, p. 9661-9672, 2021. Disponível em: <https://www.brazilianjournals.com/ojs/index.php/BRJD/article/download/23742/19073?__cf_chl_tk=r9AkO9EAaAdOXalh0kDy2an3WeQ007LIMXq1yGuJ938-1699843527-0-gaNycGzNDdA>. Acesso em: 02 nov. 2023.

FLORES, Joana et al. Bacteriófagos no tratamento de feridas. **Cadernos de Saúde**, v. 3, n. Especial, p. 107-108, 2010. Disponível em: <<https://doi.org/10.34632/cadernosdesaude.2010.3021>>. Acesso em: 22 ago. 2023.

FONSECA, Leonor; DE MARCO, Paolo. Inibição de fatores de virulência em *S. aureus* e em *P. aeruginosa*. **RevSALUS-Revista Científica Internacional da Rede Acadêmica das Ciências da Saúde da Lusofonia**, v. 4, n. Sup, p. 103-103, 2022. Disponível em: < file:///C:/Users/gabri/Downloads/Suplemento+No+4+da+RevSALUS+-+Congress+o+Internacional_Abril_2022_AF-20-01-23-103%20(1).pdf>. Acesso em: 22 ago. 2023.

FU, Weiling et al. Bacteriophage cocktail for the prevention of biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* on catheters in an in vitro model system. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 54, n. 1, p. 397-404, 2010. Disponível em: < <https://doi.org/10.1128/aac.00669-09>>. Acesso em: 01 ago. 2023.

GARCÍA SALAZAR, Ivone Alexandra; PORRAS NICHU, Mauricio Yvan. Aislamiento de bacteriófagos de *Pseudomonas aeruginosa* multidrogo-resistente en aguas de tres ríos de la Provincia de Lima-Perú. 2018. Disponível em: < <https://doi.org/10.1128/aac.00669-09>>. Acesso em: 01 nov. 2023.

GARCIA, Keila Carolina de Ornellas Dutka. Utilização de bacteriófagos ambientais no controle de biofilmes de *Salmonella* spp. em superfícies utilizadas na indústria de processamento e comercialização de frango de corte e derivados. 2015. Disponível em: < <https://repositorio.unesp.br/handle/11449/132128>>. Acesso em: 05 nov. 2023.

GILBOA-GARBER, Nechama. [32] *Pseudomonas aeruginosa* lectins. In: **Methods in enzymology**. Academic Press, 1982. p. 378-385. Disponível em: < [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(82\)83034-6](https://doi.org/10.1016/0076-6879(82)83034-6)>. Acesso em: 08 nov. 2023.

GOMES, Maysa Wanderley Nóbrega et al. A Importância da Higienização das Próteses Implantossuportadas: Revisão da literatura. **Revista da AcBO-ISSN 2316-7262**, v. 7, n. 3, 2018. Disponível em: < <http://www.rvacbo.com.br/ojs/index.php/ojs/article/view/414>>. Acesso em: 19 out. 2023.

GOMES, Raylane et al. Produção de exopolissacarídeos a partir de bastonetes grampositivos isolados de contaminantes de cultura de tecido vegetal. **ENCICLOPEDIA BIOSFERA**, v. 13, n. 24, 2016. . Disponível em: < <http://www.rvacbo.com.br/ojs/index.php/ojs/article/view/414>>. Acesso em: 05 nov. 2023.

GOUVEIA, Clovis Queiroz et al. Qualificação da atividade inibitória da cafeína sobre motilidade e formação de biofilme em *Pseudomonas aeruginosa*. 2022. Disponível em: < <https://repositorio.ufpb.br/jspui/handle/123456789/28151>>. Acesso em: 06 set. 2023.

GRANDO, Carolaine da Silva Grando et al. Uso de bacteriófagos na indústria de alimentos: Estudo de caso. 2021. Disponível em: < <https://repositorio.ufsc.br/handle/123456789/234038>>. Acesso em: 06 nov. 2023.

GUTERRES, Karina Affeldt et al. Ocorrência de otite canina por *Pseudomonas* spp. e sensibilidade dos isolados registrados no laboratório regional de diagnóstico no período de dez anos. **Science And Animal Health**, v. 8, n. 1, p. 55-64, 2020. Disponível em: < DOI: <https://doi.org/10.15210/sah.v8i1.17521>>. Acesso em: 19 out. 2023.

HOLZAPFEL, B.M. et al. How smart do materials need to be?: a translational science and clinical point of view. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2013, in press. Disponível em: < DOI: 10.1016/j.addr.2012.07.009>. Acesso em: 12 out. 2023.

HUSSEIN, Maytham et al. Metabolomics study of the synergistic killing of polymyxin B in combination with amikacin against polymyxin-susceptible and-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 64, n. 1, p. 10.1128/aac.01587-19, 2019. Disponível em: < <https://journals.asm.org/doi/full/10.1128/aac.01587-19>>. Acesso em: 11 set. 2023.

JORQUERA, Denisse; GALARCE, Nicolás; BORIE, Consuelo. El desafío de controlar las enfermedades transmitidas por alimentos: bacteriófagos como una nueva herramienta biotecnológica. **Revista chilena de infectología**, v. 32, n. 6, p. 678-688, 2015. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.4067/S0716-10182015000700010> >. Acesso em: 09 out. 2023.

LAZAR, V. Quorum sensing in biofilms - How to destroy the bacterial citadels or their cohesion/power? *Anaerobe*, v. 17, p. 280-285, 2011. Disponível em: < <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2011.03.023>>. Acesso em: 19 ago. 2023.

LAZARETTI, Alvaro et al. RESISTÊNCIA DA BACTÉRIA PSEUDOMONAS AERUGINOSA AOS ANTIBIÓTICOS CARBAPENÊMICOS. **Revista Multidisciplinar em Saúde**, p. 10-19, 2022. Disponível em: < <https://doi.org/10.51161/rem/3441>>. Acesso em: 05 ago. 2023.

LEMON, Peter WR. Is increased dietary protein necessary or beneficial for individuals with a physically active lifestyle?. **Nutrition reviews**, v. 54, n. 4, p. S169-S175, 1996. Disponível em: < https://www.researchgate.net/profile/Peter-Lemon/publication/14502763_Is_Increased_Dietary_Protein_Necessary_or_Beneficial_for_Individuals_with_a_Physically_Active_Lifestyle/links/621551e6791f4437f1572996/Is-Increased-Dietary-Protein-Necessary-or-Beneficial-for-Individuals-with-a-Physically-Active-Lifestyle.pdf>. Acesso em: 02 nov. 2023.

LERAYER, Alda Luiza Santos; CHOPIN, Marie-Christine. Perfil de plasmídios e resistência a bacteriófagos em estreptococos lácticos mesófilos. **Rev. microbiol**, p. 197-209, 1989. Disponível em: < <https://pesquisa.bvsalud.org/portal/resource/pt/lil-279982>>. Acesso em: 09 ago. 2023.

LI, Xin et al. Novel approaches to combat medical device-associated biofilms. **Coatings**, v. 11, n. 3, p. 294, 2021. Disponível em: < <https://doi.org/10.3390/coatings11030294>>. Acesso em: 22 out. 2023.

LIMA, Maria Letícia Xavier de. **Uma revisão da literatura sobre Pseudomonas aeruginosa: fatores de virulência e resistência bacteriana**. 2022. Trabalho de Conclusão de Curso. Universidade Federal do Rio Grande do Norte. Disponível em: < <https://repositorio.ufrn.br/handle/123456789/48502>>. Acesso em: 01 ago. 2023.

LOPEZ JACOME, Luis Esau et al. Situation and perspective of infections by multi-drug resistant organisms. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 13, p. 1327413. Disponível em: < doi: 10.3389/fcimb.2023.1327413>. Acesso em: 02 nov. 2023.

LUCCHESI, E. G. Desenvolvimento de sistema de obtenção de biofilmes in vitro e avaliação de sua susceptibilidade a biocidas. Dissertação de Mestrado em Biotecnologia – Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2006. Disponível em: <<http://repositorio.unicamp.br/jspui/handle/REPOSIP/266285>>. Acesso em: 22 ago. 2023.

LUJÁN ROCA, Daniel Ángel. Pseudomonas aeruginosa: um adversário perigoso. **Acta bioquímica clínica latinoamericana**, v. 4, pág. 465-474, 2014. Disponível em: <http://www.scielo.org.ar/scielo.php?pid=S0325-29572014000400009&script=sci_arttext&tlng=pt>. Acesso em: 10 ago. 2023.

LYNCH, A.S.; ROBERTSON, G.T. Bacterial and fungal biofilm infections. Annual Re-view of Medicine, v. 59, p. 415-428, 2008. Disponível em: <<https://www.annualreviews.org/doi/abs/10.1146/annurev.med.59.110106.132000>>. Acesso em: 02 ago. 2023.

MACEDO, A.J.; ABRAHAM, W.R. Can infectious biofilm be controlled by block-ing bacterial communication? Medicinal Chemistry, v. 5, p. 517-528, 2009. Disponível em: <<https://doi.org/10.2174/157340609790170515>>. Acesso em: 06 set. 2023.

MADSEN, J.S. et al. The interconnection between biofilm formation and horizontal gene transfer. FEMS Immunology and Medical Microbiology, v. 65, p. 183-195, 2012. Disponível em: <<https://doi.org/10.1111/j.1574-695X.2012.00960.x>>. Acesso em: 02 ago. 2023.

MAGALHÃES, Joana Nunes de Moura Pinheiro de. **Importância da formação de biofilmes nas infecções associadas a próteses ortopédicas**. 2011. Tese de Doutorado. [sn]. Disponível em: <<http://hdl.handle.net/10284/2468>>. Acesso em: 03 set. 2023.

MILHO, C.; SILVA, M. D.; SILLANKORVA, S.; HARPER, D. R. Biofilm Applications of Bacteriophages. 2019. Disponível em: https://link.springer.com/referenceworkentry/10.1007/978-3-319-41986-2_27. Acesso em: 8 jun. 2023.

MONROE, Don. Looking for chinks in the armor of bacterial biofilms. **PLoS biology**, v. 5, n. 11, p. e307, 2007. Disponível em: <<https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0050307>>. Acesso em: 08 out. 2023.

MORAIS, Aléxia Pinheiro et al. Análise da produção de biofilme por cepas de Pseudomonas aeruginosa carreando o gene aac (6')-Ib7. 2021. Disponível em: <<https://repositorio.ufu.br/bitstream/123456789/33025/3/AnaliseProducaoBiofilme.pdf>>. Acesso em: 03 out. 2023.

MORAES JUNIOR, Edgard Franco et al. Implantação imediata em área estética: descrição de caso. **Rev. Salusvita (Online)**, p. 685-694, 2018. Disponível em: <<https://pesquisa.bvsalud.org/portal/resource/pt/biblio-1050760>>. Acesso em: 02 ago. 2023.

MORETTI, Débora Monteiro; UZIEL, Daniela; ROZENTAL, Renato. Inovação em produtos para saúde: uma experiência na visão do empreendedor. **COMPLEXO INDUSTRIAL**, p. 151, 2017. Disponível em: <https://superaparque.com.br/upload/20171227-111252-Avancos_desafios_complexo_industrial_produtos_saude.pdf#page=152>. Acesso em: 22 ago. 2023.

MULET, Magdalena et al. Pseudomonas species diversity along the danube river assessed by rpoD gene sequence and MALDI-TOF MS analyses of cultivated strains. **Frontiers in Microbiology**, v. 11, p. 2114, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.02114>>. Acesso em: 22 out. 2023.

MURRAY, Christopher JL et al. Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis. *The Lancet*, 2022. Disponível em: . Acesso em: 15 out. 2023.

National Institutes of Health [Inter-net]. 2002. Disponível em: <https://grants.nih.gov/grants/guide/pa-files/PA-03-047.html>. Acesso em: 18 ago. 2023.

NEIDELL, M.J. et al. Costs of healthcare-and Community-associated infections with antimicrobial-resistant versus antimicrobial-susceptible organisms. *Clinical Infectious Diseases*, v. 55, p. 807-815, 2012. Disponível em: <doi: 10.1093/cid/cis552.>. Acesso em: 18 ago. 2023.

NEVES, Patrícia R. et al. Pseudomonas aeruginosa multirresistente: um problema endêmico no Brasil. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 47, p. 409-420, 2011. Disponível em: <<https://doi.org/10.1590/S1676-24442011000400004>>. Acesso em: 20 out. 2023.

NEVES, Isabel Catarina Pinto Alves das. **Avaliação clínica dos dispositivos médicos**. 2019. Tese de Doutorado. Disponível em: <https://bdigital.ufp.pt/handle/10284/8734>. Acesso em: 09 nov. 2023.

NICHOLS, W.W. et al. Inhibition of tobra-mycin diffusion by binding to alginate. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 32, p. 518-523, 1988. Disponível em: <doi: 10.1128/aac.32.4.518>. Acesso em: 24 out. 2023.

NOVELLO, Junia Cápua de Lima. Implantação de íons de prata em aço inoxidável e infecção fágica para o controle de adesão e formação de biofilmes bacterianos na indústria de alimentos. 2012. Disponível em: <<http://locus.ufv.br/handle/123456789/466>>. Acesso em: 09 out. 2023.

OLIVEIRA, Tainá Pereira da Silva. **Nanopartículas Metálicas: estratégia terapêutica para prevenção da formação e erradicação de biofilmes bacterianos**. 2022. Trabalho de Conclusão de Curso. Disponível em: <<https://repositorio.ufpe.br/handle/123456789/47461>>. Acesso em: 17 ago. 2023.

OLIVEIRA, Viviane de Cássia. Bacteriófagos com potencial aplicabilidade em tubos endotraqueais: avaliação das atividades antibacteriana e antibiofilme. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo. Disponível em: <https://doi.org/10.11606/T.22.2021.tde-24082021-155007>. Acesso em: 18 out. 2023.

OMS. Organização Mundial de Saúde. Relatório Mundial sobre Prevenção e Controle de Infecções. Genebra, 2022. Disponível em: <<https://www.who.int/publications/m/item/global-report-on-infection-prevention-and-control>>. Acesso em: 19 out. 2023.

ORTEGA, Letícia de Lima et al. Resistência bacteriana: aquisição, mecanismos e prevenção. 2019. Disponível em: < <https://repositorio.ufsc.br/handle/123456789/201644>>. Acesso em: 03 out. 2023.

O'TOOLE, G.A.; KOLTER, R. Flagellar and twitching motility are necessary for Pseudomonas aeruginosa biofilm development. *Molecular Microbiology*, v. 30, p. 295-304, 1998. Disponível em: <<https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1998.01062.x>>. Acesso em: 10 ago. 2023.

OTTO, M. Staphylococcal infections: mechanisms of biofilm maturation and detachment as critical determinants of pathogenicity. *Annual Review of Medicine*, v. 64, p. 175-188, 2013. Disponível em: < <https://www.annualreviews.org/doi/abs/10.1146/annurev-med-042711-140023> >. Acesso em: 14 out. 2023.

PAVITHRA, D.; DOBLE, M. Biofilm formation, bacterial adhesion and host response on polymeric implants-issues and prevention. *Biomedical Materials*, v. 3, p. 1-13, 2008. Disponível em: <**DOI** 10.1088/1748-6041/3/3/034003>. Acesso em: 16 ago. 2023.

PAISANO, Adriana Fernandes. **Estudo in vitro da ação antimicrobiana de bacteriófagos em canais radiculares infectados por isolados clínicos de Enterococcus faecalis**. 2008. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo. Disponível em: < <https://doi.org/10.11606/T.23.2008.tde-11042008-113518>>. Acesso em: 12 ago. 2023.

PANIAGUA MURGA, Sally Miluska. Factores de riesgo asociados a itu por pseudomonas aeruginosa multirresistente en pacientes hospitalizados-Hospital Nacional Dos De Mayo, 2017. 2019. Disponível em: < https://repositorio.unfv.edu.pe/bitstream/handle/20.500.13084/3226/UNFV_PANIAGUA_MURGA_SALLY_MILUSKA_TITULO_PROFESIONAL_2019.pdf?sequence=1&isAllowed=y>. Acesso em: 20 out. 2023.

PAZ-ZARZA, Victor Manuel et al. Pseudomonas aeruginosa: patogenicidad y resistencia antimicrobiana en la infección urinaria. *Revista chilena de infectología*, v. 36, n. 2, p. 180-189, 2019. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.4067/S0716-10182019000200180> >. Acesso em: 08 out. 2023.

PERADOTTO, Marco et al. Comparison of Three Different Commercial Methods for Fosfomicin Susceptibility Testing in Pseudomonas aeruginosa. **Microbial Drug Resistance**, v. 28, n. 9, p. 911-915, 2022. Disponível em: < <https://doi.org/10.1089/mdr.2021.0410>>. Acesso em: 02 nov. 2023.

PIMENTEL, Barbara Riquena. Erradicação da Pseudomonas aeruginosa na colonização inicial em pacientes com fibrose cística: avaliação do protocolo de um centro de referência. 2019. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo. Disponível em: < <https://doi.org/10.11606/D.5.2019.tde-07052019-141350>>. Acesso em: 19 out. 2023.

PIRES, Bruna Maiara Ferreira Barreto et al. Análise microbiológica e capacidade de formação de biofilme bacteriano em cepas de pseudomonas aeruginosa e staphylococcus aureus encontrados em úlceras venosas tratadas com plasma rico em plaquetas. 2018. Disponível em: < <https://pesquisa.bvsalud.org/portal/resource/pt/biblio-1023933>>. Acesso em: 11 ago. 2023.

PIRES, Ana Luiza R.; BIERHALZ, Andréa CK; MORAES, Ângela M. Biomateriais: tipos, aplicações e mercado. **Química nova**, v. 38, p. 957-971, 2015. Disponível em: < <https://doi.org/10.5935/0100-4042.20150094>>. Acesso em: 14 out. 2023.

QUEIROGA, Marcelo Cartaxo et al. Implante por cateter de bioprótese valvular aórtica para tratamento de estenose valvar aórtica grave em pacientes inoperáveis sob perspectiva da saúde suplementar: análise de custo-efetividade. **Revista Brasileira de Cardiologia Invasiva**, v. 21, p. 213-220, 2013. Disponível em: < <https://doi.org/10.1590/S2179-83972013000300004>>. Acesso em: 09 out. 2023.

RAMA, Debora; FONSECA, Bianca; BLANCK, Mara. 1a Recomendação brasileira para o gerenciamento de biofilme em feridas crônicas e complexas. 2018. Disponível em: < <http://hdl.handle.net/10400.26/27331>>. Acesso em: 03 ago. 2023.

RÉ, Ana Carolina dos Santos. **Estudo de protocolos de extração e caracterização química de polissacarídeo de parede celular e polissacarídeo intracelular de biofilme patogênico de Streptococcus mutans**. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo. Disponível em: < <https://doi.org/10.11606/T.60.2022.tde-31082023-110037>>. Acesso em: 17 ago. 2023.

REYNOLDS, Dan; KOLLEF, Marina. A epidemiologia, patogênese e tratamento das infecções por Pseudomonas aeruginosa: uma atualização. **Drogas**, v. 81, n. 18, pág. 2117-2131, 2021. Disponível em: <<https://link.springer.com/article/10.1007/s40265-021-01635-6>>. Acesso em: 11 out. 2023.

RIBEIRO, Henrique Gonçalves. **Desenvolvimento de um produto antimicrobiano com mel português e bacteriófagos**. 2016. Tese de Doutorado. Disponível em: < <https://hdl.handle.net/1822/46543>>. Acesso em: 07 ago. 2023.

RIBEIRO, Thais Marchand. Utilização de bacteriófagos para desinfecção de canais radiculares: uma revisão de literatura narrativa ilustrada. 2021. Disponível em: <https://www.lume.ufrgs.br/handle/10183/238461>. Acesso em: 03 nov.2023.

ROLLET, Cécile; GAL, Laurent; GUZZO, Jean. Biofilm-detached cells, a transition from a sessile to a planktonic phenotype: a comparative study of adhesion and physiological characteristics in Pseudomonas aeruginosa. **FEMS microbiology letters**, v. 290, n. 2, p. 135-142, 2009. Disponível em: < <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2008.01415.x>>. Acesso em: 05 out. 2023.

ROMERO, M.; ACUÑA, L.; OTERO, A. Pa-tents on quorum quenching: interfering with bacterial communication as a strategy to fight infections. *Recent Patents on Biotechnology*, v. 6, p. 2-12, 2012. Disponível em: < <https://doi.org/10.2174/187220812799789208> >. Acesso em: 05 out. 2023.

ROSSI, Elio et al. Adaptação e evolução de Pseudomonas aeruginosa em pacientes com fibrose cística. **Nature Reviews Microbiologia**, v. 5, pág. 331-342, 2021. Disponível em: < <https://doi.org/10.2174/187220812799789208> >. Acesso em: 02 nov. 2023.

SANTANA, Marcelo Felipe da Silva Estácio de; PIMENTEL FILHO, Natan de Jesus. Biofilmes de patógenos na indústria de alimentos: uma revisão sobre a sua formação e

controle. 2023. Disponível em: < <https://repositorio.ufscar.br/handle/ufscar/17>>. Acesso em: 07 out. 2023.

SANTOS, Neusa de Queiroz. Bacterial resistance in the context of hospital infection. **Texto & Contexto-Enfermagem**, v. 13, p. 64-70, 2004. Disponível em: <<https://doi.org/10.1590/S0104-07072004000500007>>. Acesso em: 06 nov. 2023.

SANTOS JUNIOR, Ariosvaldo Pereira dos. Caracterização dos bacteriófagos ZC01 e ZC03 e avaliação de seu potencial para fagoterapia em infecções por *Pseudomonas aeruginosa*. 2020. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo. Disponível em: < <https://doi.org/10.11606/D.46.2020.tde-24092021-104249>>. Acesso em: 07 nov. 2023.

SANTOS, Cleidson. Impactos das inovações tecnológicas ao tratamento e cicatrização de feridas crônicas/complexas: uma revisão integrativa. 2022. Disponível em: < <https://repositorio.animaeducacao.com.br/handle/ANIMA/23454>>. Acesso em: 06 nov. 2023.

SANTOS, E. Díaz et al. Tratamiento de las infecciones graves por *Pseudomonas aeruginosa* multirresistente. **Medicina Intensiva**, v. 46, n. 9, p. 508-520, 2022. Disponível em: < <https://doi.org/10.1016/j.medin.2022.03.015>>. Acesso em: 05 out. 2023.

SAHADE, Luana Ferreira. Caracterização fenotípica e análise de genes de expressão de biofilme em cepas de *Pseudomonas aeruginosa* isoladas em abatedouro-frigorífico bovino. 2019. Disponível em: < <https://repositorio.unesp.br/handle/11449/182131>>. Acesso em: 08 out. 2023

SCHABER, J.A. et al. *Pseudomonas aeruginosa* forms biofilms in acute infection independent of cell-to-cell signaling. *Infection and Immunity*, v. 75, p. 3715-3721, 2007. Disponível em: < <https://doi.org/10.1128/iai.00586-07>>. Acesso em: 29 out. 2023.

SCHMALZ, Gottfried; GALLER, Kerstin M. Biocompatibility of biomaterials—Lessons learned and considerations for the design of novel materials. **Dental Materials**, v. 33, n. 4, p. 382-393, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.dental.2017.01.011>. Acesso em: 03 nov. 2023.

SHILPAKAR, Aryatara et al. Prevalence of multidrug-resistant and extended-spectrum beta-lactamase producing Gram-negative isolates from clinical samples in a tertiary care hospital of Nepal. **Tropical Medicine and Health**, v. 49, n. 1, p. 1-9, 2021. Disponível em: < <https://tropmedhealth.biomedcentral.com/articles/10.1186/s41182-021-00313-3>>. Acesso em: 30 out. 2023.

SILLANKORVA, Sanna. Isolation of bacteriophages for clinically relevant bacteria. **Bacteriophage Therapy: From Lab to Clinical Practice**, p. 23-30, 2018. Disponível em: < https://link.springer.com/protocol/10.1007/978-1-4939-7395-8_3>. Acesso em: 16 out. 2023.

SISAKHTPOUR, Behnam et al. The characteristic and potential therapeutic effect of isolated multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* lytic phage. **Annals of clinical microbiology and antimicrobials**, v. 21, n. 1, p. 1-11, 2022. Disponível em: < <https://ann-clinmicrob.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12941-022-00492-9>>. Acesso em: 6 nov. 2023.

SILVA, Fernanda Pereira da. Caracterização biológica e molecular de um bacteriófago específico para *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. 2015. Disponível em: < <http://www.locus.ufv.br/handle/123456789/6502>>. Acesso em: 6 nov. 2023.

SILVA, Keila de Cássia Ferreira de et al. Resistência aos carbapenêmicos em cepas de *Pseudomonas aeruginosa* ST2236 e ST2237 não produtoras de carbapenemases. 2023. Disponível em: < <https://app.homologacao.uff.br/riuff/handle/1/27614>>. Acesso em: 11 out. 2023.

SOBRAL, Glebson Santos. Perfil microbiológico de culturas coletadas de pacientes internados numa unidade de terapia intensiva. 2023. Disponível em: <https://ri.ufs.br/jspui/handle/riufs/17865>. Acesso em: 03 nov.2023.

TANAKA, G. et al. Effect of the growth rate of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms on the susceptibility to antimicrobials agents: beta-lactams and fluoroquinolones. *Chemotherapy*, v. 45, p. 28-36, 1999. Disponível em: < DOI: 10.1159/000007162>. Acesso em: 25 out. 2023.

TINOCO, Justine Monteiro Monnerat et al. Efeito antimicrobiano do bacteriófago geneticamente modificado ϕ Ef11/ ϕ FL1C (Δ 36) PnisA sobre cepas de *E. faecalis* em biofilme estático e em canais radiculares infectados. 2017. Disponível em: < <http://www.btd.uerj.br/handle/1/14059>>. Acesso em: 25 out. 2023.

TORRES, Bruna Gaelzer Silva. Modelagem farmacocinética/farmacodinâmica (PK/PD) para caracterização do efeito do ciprofloxacino em infecções com biofilmes de *Pseudomonas aeruginosa*. 2016. Disponível em: < <http://www.btd.uerj.br/handle/1/14059>>. Acesso em: 05 out. 2023.

TUON, Felipe Francisco et al. Patogênese do biofilme de *Pseudomonas aeruginosa*: uma revisão. **Patógenos**, v. 11, n. 3, pág. 300, 2022. Disponível em: < <https://www.mdpi.com/2076-0817/11/3/300>>. Acesso em: 03 nov. 2023.

VAZ, C. S. L.; RECH, D. V.; COLDEBELLA, A. Bacteriófagos: estudo da ação lítica sobre *Salmonella* Minnesota isoladas de cama de frango. 2022. Disponível em: < <https://www.alice.cnptia.embrapa.br/alice/bitstream/doc/1143258/1/final9873.pdf>>. Acesso em: 14 out. 2023.

VEIGA, Patrícia Isabel Martins. **Caracterização de bacteriófagos de *Proteus mirabilis* e avaliação da sua eficácia em biofilmes**. 2014. Tese de Doutorado. Disponível em: < <https://hdl.handle.net/1822/41824>>. Acesso em: 11 out. 2023.

VERDEROSA, Anthony D.; TOTSIKA, Makrina; FAIRFULL-SMITH, Kathryn E. Bacterial biofilm eradication agents: a current review. **Frontiers in chemistry**, v. 7, p. 824, 2019. Disponível em: < <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fchem.2019.00824>>. Acesso em: 30 ser. 2023.

VESTBY, Lene K. et al. Bacterial biofilm and its role in the pathogenesis of disease. **Antibiotics**, v. 9, n. 2, p. 59, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.3390/antibiotics9020059>>. Acesso em: 18 ago. 2023.

VETRIVEL, Aishwarya et al. Pseudomonas aeruginosa biofilm formation and its control. *Biologics*, v. 1, n. 3, p. 312-336, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.3390/biologics1030019>>. Acesso em: 25 out. 2023.

VIEIRA, Claudia Cristina Augusto Rodrigues et al. Perfil de resistência de pseudomonas aeruginosa em uma unidade pública materno-infantil na pandemia da covid-19. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 26, p. 101761, 2022. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.bjid.2021.101761>>. Acesso em: 11 out. 2023.

VILAÇA, Rana Mara Andrade et al. Fotossensibilizadores de origem natural: extração, caracterização e recentes avanços na fotoinativação bacteriana. **Brazilian Journal of Health Review**, v. 6, n. 5, p. 23436-23457, 2023. Disponível em: <<https://doi.org/10.34119/bjhrv6n5-405>>. Acesso em: 05 nov. 2023.

WATERS, Elaine M. et al. Phage therapy is highly effective against chronic lung infections with Pseudomonas aeruginosa. **Thorax**, v. 72, n. 7, p. 666-667, 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.3390/antibiotics9020059>>. Acesso em: 06 nov. 2023.

WEBBER, Bruna. Atividade antimicrobiana de óleos essenciais e bacteriófagos sobre Salmonella Heidelberg multirresistentes e formadoras de biofilmes. 2020. Disponível em: <<https://www.lume.ufrgs.br/handle/10183/255459>>. Acesso em: 12 nov. 2023.

WECKX, Luc; DA UNIFESP–ESCOLA, Titular de ORL. BJORL. org. **Brazilian Journal of Otorhinolaryngology**, v. 78, n. 2, p. 2, 2012. Disponível em: <<https://doi.org/10.1590/S1808-86942012000200001>>. Acesso em: 12 out. 2023.

WENZEL, R.P. Health care-associated infections: major issues in the early years of the 21st century. *Clinical Infectious Disease*, v. 45, p. 85-88, 2007. Disponível em: <DOI: 10.1086/518136>. Acesso em: 25 set. 2023.

Wright A, Hawkins C, Änggård E, Harper D. Um ensaio clínico controlado de uma preparação terapêutica de bacteriófagos em otite crônica devido a Pseudomonas aeruginosa resistente a antibióticos ; um relatório preliminar de eficácia. *Clin Otorlaringol*. 2009;34:349–57. Disponível em: <<https://doi.org/10.1111/j.1749-4486.2009.01973.x>>. Acesso em: 05 nov. 2023.

ANEXO

Anexo A – Certificado de qualidade titânio.



Empresa Certificada:
ISO 13485
ISO 9001



CERTIFICADO DE QUALIDADE

N Certificado: 0277/2019 ✓

Nota Fiscal: 9183

N Pedido: 4919

N Pedido Cliente: E-mail de 06/02/2019

Data: 07/02/2019

N Certificado de Origem: 118818

Cliente: IMPLACIL DE BORTOLI MATERIAL ODONTOLOGICO LTDA

Peso: 16,5

Corrida: H28193

Dados do Material		
Material	Especificação	Tolerância
Barra de Titânio Puro GR4 Diâmetro 5,50mm	ASTM F67 GR4 e ISO 5832-2	+ 0 / - 0,018
Tratamento Térmico	Observação	Diâmetro
RECOZIDO		5,494 mm
Comprimentos	Acabamento	
3.075,000 mm	RETIFICADO BR	
Composição Química		
% C	% Ti	% H
0,0630 %	99,4824 %	0,0016 %
% N	% Fe	% O
0,0030 %	0,0600 %	0,3900 %
Propriedades Mecânicas		
Lim. Resistência a Tração / Tensile Strength (MPa)	Limite de escoamento / Yield Strength (MPa)	Alongamento / Elongation mínimo (%)
756,000 MPa	626,000 MPa	44,00 %
Red. de Área / Reduction in area (%)		
56,00 %		
Metalografia		
Tamanho de Grão / Grain Size	ALPHA - CASE	
10,00	NO ALPHA CASE	

Observações

Alguns dados foram extraídos do certificado de origem do fabricante da matéria prima.

Departamento da Garantia da Qualidade