



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE BOTUCATU
CURSO DE GRADUAÇÃO EM FÍSICA
MÉDICA**



TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

ARTHUR JUAN DE LIMA RAMALHO

**BIOFILMES DE ESKAPEE:
UMA REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

ARTHUR JUAN DE LIMA RAMALHO

**BIOFILMES DE ESKAPEE:
UMA REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Instituto de Biociências de Botucatu, localizado na Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Bacharel em Física Médica.

Orientador: Dr. Mário de Oliveira Neto

Botucatu 2023

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: MARIA CAROLINA A. CRUZ E SANTOS-CRB 8/10188

Ramalho, Arthur Juan de Lima.

Biofilmes de ESKAPEE : uma revisão bibliográfica /
Arthur Juan de Lima Ramalho. - Botucatu, 2023

Trabalho de conclusão de curso (bacharelado - Física
Médica) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de
Mesquita Filho", Instituto de Biociências de Botucatu

Orientador: Mário de Oliveira Neto

Capes: 20802005

1. Biofilmes. 2. Exopolissacarídeos microbianos.
3. Matriz extracelular de substâncias poliméricas.
4. Anti-infecciosos. 5. Farmacorresistência bacteriana.

Palavras-chave: Biofilme; Degradação enzimática; EPS;
ESKAPEE; Resistência bacteriana.

AGRADECIMENTOS

À meu orientador - Prof. Mário pela oportunidade de estudo, conhecimento e aprendizado proporcionado em dois grupos de pesquisa.

À banca examinadora - Prof. Joel e Prof. Vladimir por aceitarem participar da minha defesa em um fim de ano tão corrido.

À meus colegas de estágio - Por todas reuniões em que me apoiaram com a literatura e com sugestões acerca do trabalho.

À meus pais - Rosalvo e Jacilene, por todo o suporte e sacrifícios necessários para que eu chegasse até esse momento.

À meus irmãos - Ádrian e Akiane por todo companheirismo e carinho que me deram desde que nasceram.

À meus amigos - Giovana, Márcio, Maria, Gustavo, Bruno, Matheus por tornarem os anos de graduação tão divertidos.

Aos meus professores - Por todo o conhecimento compartilhado e ensinado ao longo dos anos.

Aos meus colegas - Mesmo não citando um por um, sou grato por todas oportunidades de me tornar quem sou.

Ao cursinho Atena - Pelo aprendizado que obtive ao debater ideias e transmitir meu conhecimento adiante. Que o projeto exista enquanto precisa.

RESUMO

Os microrganismos nem sempre vivem de forma livre e isolada, muitas espécies buscam se agrupar em um conglomerado e se aderir a uma superfície. Denomina-se biofilme os seres microbianos que, ao fazerem isso, liberam substâncias poliméricas extracelulares (EPS) e ficam envolvidos em uma matriz cheia de compostos extracelulares. Essas substâncias favorecem a adesão destes micróbios a superfícies, proporcionam a sua multiplicação e maturação, atuam como reservas energéticas e proteção contra agentes externos, entre outras funções. No caso de microrganismos bacterianos, o biofilme cria um cenário perfeito para a sua proliferação. A EPS protege as bactérias da ação antibiótica, permitindo sua sobrevivência e adaptação e tornando seu tratamento muito mais desafiador. Dentre as bactérias que produzem biofilme existe um grupo seletivo conhecido como “ESKAPEE”. Acrônimo para sete bactérias capazes de “escapar” de agentes antimicrobianos e que são as principais causadoras de infecções bacterianas hospitalares. Nessa monografia, foi feita uma revisão bibliográfica sobre biofilmes bacterianos com enfoque nas ESKAPEE e com o intuito de elucidar as partes mais importante deste tema, juntamente com informações a respeito das principais substâncias que compõe o biofilme delas e quais enzimas já são conhecidas pela capacidade de degradá-los.

Palavras-chave: Biofilme; ESKAPEE; Degradação Enzimática; Resistência Bacteriana; Exopolissacarídeos; EPS

ABSTRACT

Microorganisms do not always live freely and isolated, many species seek to group together in a conglomerate and adhere to a surface. Microbes that, when doing so, release extracellular polymeric substances (EPS) and become involved in a matrix full of extracellular compounds are called biofilms. These substances facilitate the adhesion of these microbes to surfaces, promote their multiplication and maturation, act as energy reserves, act as protection against external agents, among other functions. When these microbes are bacteria, the EPS creates a dangerous scenario for their proliferation because it can protect bacterial colonies from antibiotic action, allowing them to adapt and become much more difficult to treat. Among the bacteria that produce biofilm, there is a group named “ESKAPEE”. It is an acronym for seven bacteria capable of “escaping” antimicrobial agents and which are the main causes of hospital-acquired bacterial infections. In this work, a bibliographical review was carried out on these subjects with the objective of elucidating the key parts of the mentioned themes, together with information regarding the composition of the main substances of ESKAPEE biofilms, and which enzymes are already known for their ability to degrade them.

Keywords: Biofilm; ESKAPEE; Enzymatic Degradation; Bacterial resistance; Exopolysaccharides; EPS

SUMÁRIO

Introdução	9
Objetivo	9
1. Biofilmes microbianos	9
1.1 Formação de um biofilme microbiano	10
1.2 Composição da matriz extracelular de biofilmes microbianos	11
1.4 Funcionalidades da matriz extracelular	11
2. Bactérias	12
2.1 Resistência bacteriana e ação antibiótica	13
2.2 ESKAPEE	15
2.2.0 <i>Enterococcus faecium</i>	16
2.2.1 <i>Staphylococcus aureus</i>	16
2.2.2 <i>Klebsiella pneumoniae</i>	17
2.2.3 <i>Acinetobacter baumannii</i>	17
2.2.4 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	17
2.2.5 <i>Enterobacter spp</i>	18
2.2.6 <i>Escherichia coli</i>	18
3. Biofilmes bacterianos	18
3.1 Formação do Biofilme	19
3.2 Componentes principais dos biofilmes de ESKAPEE	22
3.2.0 <i>Enterococcus faecium</i>	23
3.2.1 <i>Staphylococcus aureus</i>	23
3.2.2 <i>Klebsiella pneumoniae</i>	23
3.2.3 <i>Acinetobacter baumannii</i>	23
3.2.4 <i>Pseudomonas aeruginosas</i>	23
3.2.5 <i>Enterobacter spp</i>	24
3.2.6 <i>Escherichia coli</i>	24
4. EPSs e enzimas que as degradam	24
4.1 PNAG	24
4.2 Alginato, Pel, Psl	25
4.3 Celulose	26
4.4 Ácido colânico	27
4.5 Bap	27
4.6 eDNA	28
5. CONCLUSÃO	29
REFERÊNCIAS	30

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Diferenças na parede celular de acordo com a coloração gram... ..	13
Figura 2: Representação visual das fases de formação de um biofilme.	22
Figura 3: Estrutura química da Poli- β -1-6-N-acetilglucosamina	24
Figura 4: Estrutura química dos polissacarídeos alginato e Psl... ..	26
Figura 5: Estrutura química da celulose.....	26
Figura 6: Estrutura química do ácido colânico.....	27

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Principais EPS nas ESKAPEE... ..	22
Tabela 2: Enzimas que degradam importantes EPS... ..	29

Introdução

Os microrganismos podem ser encontrados na natureza em duas formas principais de existência: a planctônica de vida livre, e a sésil. Ao se aderir permanentemente a uma superfície e se envolver em uma matriz extracelular composta de diversas substâncias poliméricas, tomam o nome de biofilme (Vu, 2009; Donlan, 2002). Embora diversos microrganismos possam secretar essas substâncias e serem classificados como biofilmes, os bacterianos são particularmente perigosos. Isso se deve ao fato das matrizes extracelulares possuírem múltiplas funcionalidades que atuam na proteção das células e na futura reprodução e dispersão das colônias de bactérias (Charron, 2013; Donlan, 2002; Flemming, 2010). Assim permitindo com que essas bactérias resistam a ação antibiótica e possam se adaptar a novos agentes antimicrobianos. Elas possuem também capacidade de passar essa resistência adiante, e isso torna possível o surgimento de superbactérias, bactérias capazes de resistir a múltiplas ações antibacterianas (Blair, 2014; Collignon, 2019). Dentre as bactérias produtoras de biofilmes existe um grupo denominado ESKAPEE, um acrônimo para as principais espécies de bactérias causadoras de infecções hospitalares: *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter sp.* e *Escherichia coli* (Mulani, 2019; Pendleton, 2013). Existem várias alternativas para dispersar esses biofilmes, mas uma que demonstra grande futuro é a degradação enzimática, visto que as principais substâncias contidas nos biofilmes dessas bactérias já foram caracterizadas. A ação enzimática corrobora com o desmantelamento da matriz extracelular e permite que o antibiótico acesse com sucesso as colônias bacterianas (Ramakrishnan *et al*, 2022).

Objetivo

O objetivo deste trabalho foi realizar uma revisão da literatura acerca de biofilmes bacterianos. Com enfoque nos produzidos pelo grupo de bactérias ESKAPEE.

1. Biofilmes microbianos

Em 1940, Heukelekian e Heller descobriram que o crescimento e a atividade de microorganismos marinhos eram mais elevados quando estes estavam aderidos a uma superfície. Já em 1943, Zobell, também em um estudo sobre vida marinha, descobriu que

havia muito mais micróbios associados ao solo e outras superfícies do que no meio aquoso que os cercava. Essas descobertas deixaram evidente que o desenvolvimento de bactérias dentro de uma colônia é essencial para sua sobrevivência e mais comum do que se imaginava (Davey, 2000).

No século XVII, Van Leeuwenhoek observou em microscópio microorganismos aderidos à superfície da raspagem de sua própria dentição, se tornando a primeira observação deste caso, e posteriormente em 1978 o observado foi denominado por Bill Costerton como “biofilme”(Chandki *et al*, 2011). Denomina-se biofilme o conjunto de microorganismos que entram definitivamente na fase sésil ao se aderir a uma superfície biótica ou abiótica, sendo protegidos por uma matriz de substâncias poliméricas extracelulares (EPS). Essa matriz é composta principalmente por polissacarídeos, proteínas, lipídeos e DNA extracelular. A EPS mantém as células do biofilme próximas e sedentárias, conferindo ao coletivo diversas vantagens como por exemplo: reservas de energia, alta atividade enzimática extracelular e proteção contra ambientes hostis e agentes externos, como por exemplo antibióticos e o sistema imune dos hospedeiros (Verderosa, 2019; Vu, 2009; Donlan, 2002).

Em biofilmes de bactérias, essa proteção é tão eficiente que pode aumentar a necessidade de certos antibióticos em até mil vezes, devido à barreira física e a inativação enzimática dos fármacos combinados com taxas metabólicas reduzidas em muitas células associadas aos biofilmes. Essa proteção é atrelada ao biofilme em si, visto que bactérias que apresentam tolerância a certos antibióticos quando em um biofilme se mostram suscetíveis ao mesmo quando dispersas de seu estado. A matriz também atua como um meio de reciclagem de nutrientes, onde os produtos metabólicos e componentes residuais de células que sofreram lise ficam armazenados para poderem ser futuramente utilizados (Fleming, 2017; Verderosa, 2019; Charron, 2023).

1.1 Formação de um biofilme microbiano

A formação de um biofilme passa por diversas fases até atingir o estado definitivo. Inicialmente, as células planctônicas, de vida livre, se juntam e se aderem a uma superfície e passam a viver em uma colônia sésil, na qual começam a se encapsular com os primeiros vestígios de excreções de EPS. Nesta fase, ainda é possível que elas retornem à fase de vida livre, pois ainda não estão fortemente ligadas. Já no segundo estágio, as células começam a secretar exacerbadamente as EPS, o que juntamente com outras ferramentas de adesão, as tornam irreversivelmente ligadas a superfícies, levando ao acúmulo de células juntamente com a criação da matriz extracelular. Depois disso, começa a formação de multicamadas na

matriz, desenvolvendo micro colônias separadas por redes de canais por onde passa água, e levando ao amadurecimento do biofilme. No quarto estágio, o biofilme já está completamente amadurecido e possui tantas camadas que já é considerado uma colônia tridimensional. Por fim, na quinta fase, a comunidade principal secreta micro colônias para se aderirem em outras superfícies. Esses processos se aplicam à maioria dos biofilmes de vida sésil, isto é, biofilmes que não se deslocam por conta do meio em que vivem (Verderosa, 2019; Stoodley, 2002).

1.2 Composição da matriz extracelular de biofilmes microbianos

A matriz do biofilme é composta em maioria por água, podendo chegar até 97% de sua composição (Zhang, 1998). Apesar disso, as EPS são as principais responsáveis pela existência e estrutura dos biofilmes, suas funções incluem auxiliar no processo de adesão às superfícies, até a etapa final, onde se define toda arquitetura da colônia. A sua composição varia tanto entre diferentes espécies de microrganismos como também entre cepas de mesma espécie bacteriana, alterando suas propriedades físicas e químicas, variando também a eficácia de cada uma das funções da matriz (Flemming, 2010).

Composta principalmente por polissacarídeos, proteínas, lipídeos e DNA, a EPS corresponde de 50 a 90% de toda a matéria orgânica do biofilme (Flemming, 2000; Donlan, 2002). Majoritariamente ela é composta por diversos polissacarídeos (PS), e eles representam a maior parte da massa que a compõe, ao ponto que a sigla “EPS” costumava ser uma sigla para exopolissacarídeos em literaturas mais antigas antes de se descobrir a presença e importância dos outros constituintes. Essas substâncias presentes são responsáveis tanto pela formação de sua estrutura, como também aumentam significativamente a sua adesão à superfície, esta última associada com crescimento do biofilme (Harimawan, 2016).

1.4 Funcionalidades da matriz extracelular

Os PSs, em biofilmes bacterianos, juntamente com as proteínas e o DNA atuam na formação do biofilme, principalmente nas etapas de adesão e maturação mencionadas anteriormente, que configuram a caracterização das colônias como um biofilme (Flemming, 2010). Quando se fala sobre EPS é imprescindível a menção da sua função como barreira protetora em biofilmes bacterianos (Charron et al, 2023). Alguns estudos chegam até a demonstrar a capacidade da EPS de proteger contra fatores ambientais como a umidade, através de uma camada protetora contendo uma proteína anfifílica na matriz (Kovács et al, 2012). Outras funções que lhes são atribuídas dentro de um biofilme são adsorção de compostos orgânicos ou inorgânicos onde, por exemplo, Zeng (2019) demonstrou que em

algumas variações de composições, a matriz foi capaz de proporcionar resistência à metais pesados para a colônia. As proteínas nos biofilmes também possuem atuações importantes embora sejam menos numerosas e significativas do que os PS. Elas atuam principalmente nas etapas de adesão, coesão e formação estrutural do biofilme, e em bactérias também contribuem para a atividade enzimática extracelular, favorecendo a “digestão” de macromoléculas externas que adentram a EPS e facilitando a 5 etapa onde microcolônias se separam da arquitetura principal para se aderir a novas superfícies (Flemming, 2010). Os compostos da EPS também agem como reservatório de nutrientes tanto para a colônia quanto para outros seres vivos, um exemplo é a simbiose do biofilme entre microalga e bactérias (*clorelas* e *pseudomonas*) muitas vezes utilizadas em tratamentos de águas residuais devida a alta eficiência na sua capacidade de retirar e adsorver nutrientes do meio com baixo consumo energético e emissão de dióxido de carbono. A EPS guarda os nutrientes e media a transição destes entre as duas espécies presentes no biofilme além de promover cooperação entre bactérias e algas devido à produção de oxigênio pelas microalgas que promove um aumento da taxa metabólica das bactérias, resultando numa produção ainda maior de EPS no biofilme (TANG, 2021). Outro exemplo é o biofilme de *Penium margaritaceum*, uma alga verde que produz grandes quantidades de EPS rica em PS que servem de substrato para bactérias heterotróficas (Domozych, 2005).

2. Bactérias

Bactérias são, com poucas exceções, organismos unicelulares em que cada célula compõem um único indivíduo. São desprovidos de membrana nuclear, portanto seu material genético fica livre no citoplasma, concentrado em uma região chamada de nucleóide (Thanbichler, 2005; Claessen, 2014). Elas são encontradas por todo o planeta e vivem nos mais variados tipos de habitat e, apesar de serem organismos considerados simples, são notáveis pelas suas habilidades em adaptação, resistências e rápida multiplicação (Baker-Austin, 2007; Jeong, 2020).

As bactérias possuem um DNA complementar extracromossômico presente em seu citoplasma, denominado plasmídeo. Este DNA é responsável por muitas das suas principais habilidades, como conferir resistência a antibióticos e outros agentes hostis às bactérias (Kado, 2014). Quanto a sua morfologia, bactérias podem assumir mais comumente os seguintes formatos, que são determinados pelo seu DNA: cocos, bacilos, vibrião e espiral. Quando se amotinam, elas podem assumir diversos agrupamentos sendo eles: diplococos, estreptococos, estafilococos, sarcinas, diplobacilos e estreptobacilos (Claessen, 2014; Yang,

2016; Dusenbery, 2009).

A membrana celular das bactérias é principalmente formada por fosfolipídios. Na parte mais externa, elas apresentam uma composição a base de peptidoglicanos, que são cadeias de ligações entre poli ou monossacarídeos e peptídeos (Slonczewski, 2013). Essa composição permitiu à penicilina no passado ser muito eficiente no combate às bactérias, através da inibição da síntese dessas substâncias (Drugbank, 2019; Yocum, 1980).

Essa mesma membrana celular serviu para a criação de uma das principais formas de classificação de bactérias: a Gram. Bactérias Gram-positivas tipicamente apresentam uma parede celular mais grossa, composta de múltiplas camadas de peptidoglicanos. Já as Gram-negativas apresentam poucas camadas, porém envoltas por uma segunda camada lipídica contendo lipoproteínas e lipopolissacarídeos, tornando-as mais resistentes a antibióticos (Kapoor, 2017; Hugenholtz, 2002).

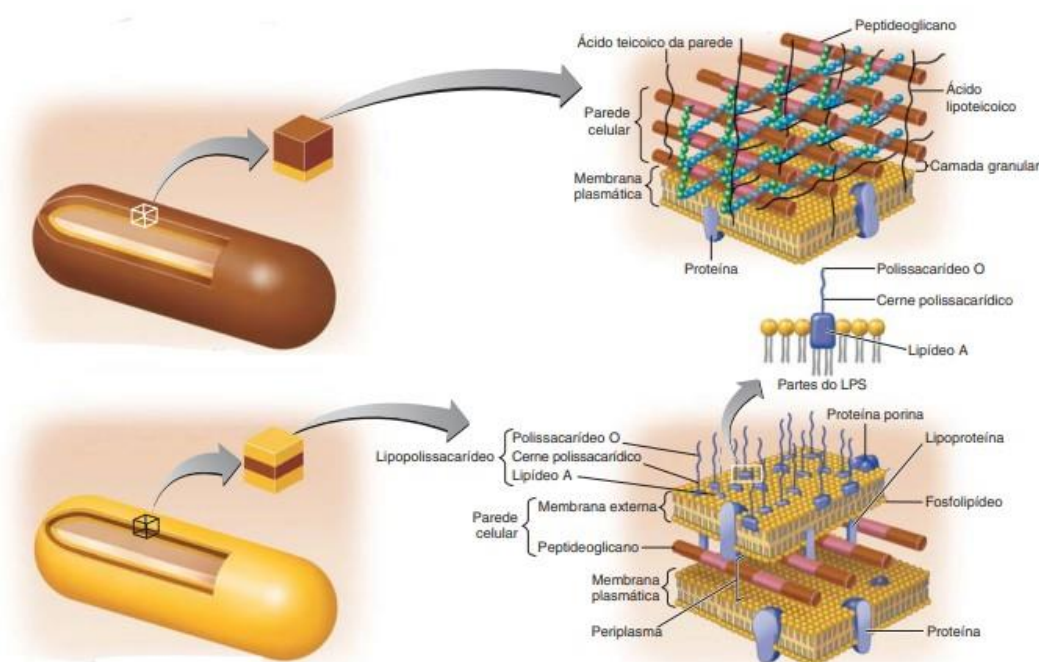


Figura 1 - Acima, uma representação didática de uma parede celular de uma bactéria gram positiva onde é possível observar sua parede celular mais grossa composta de peptidoglicanos. Embaixo uma parede celular de uma bactéria gram negativa mostrando sua maior complexidade e a segunda camada lipídica. Fonte: TORTORA, 2016.

2.1 Resistência bacteriana e ação antibiótica

A principal forma de combate a infecções bacterianas são os antibióticos, descobertos pela primeira vez com a penicilina em 1928 por Alexander Fleming, uma substância produzida por um fungo do gênero *Penicillium*, capaz de matar bactérias causadoras de doença sem danificar células animais (Hare, 1982). O mecanismo de ação da Penicilina inibe

uma transpeptidase bacteriana responsável por catalisar o processo final na síntese da parede celular. Sem a parede celular, a bactéria fica vulnerável ao meio externo, o que resulta em sua morte. Ao mesmo tempo, as células animais, que não possuem parede celular, permanecem intactas frente a exposição a essa substância (Yocum, 1980).

Todos os diferentes mecanismos de ação de antibióticos, de uma maneira ou outra, atuam incapacitando uma função celular vital das bactérias, mas, apesar do enorme sucesso dos antibióticos como agentes terapêuticos no momento do seu surgimento, após algumas décadas a eficiência dessa terapia diminuiu, com o surgimento de “superbactérias” que apresentavam resistência aos seus mecanismos de ação (Monroe, 2000).

Outros mecanismos de ação de antibióticos são classificados de acordo com a função celular vital que eles visam interromper. Suas categorias são: Antibióticos de parede celular, Inibidores de biossíntese proteica e Inibidores de replicação do DNA (Kapoor, 2017).

A fenomenal capacidade de cepas bacterianas de adquirir resistência a determinados antibióticos é proveniente do processo de seleção natural. Quando ocorrendo em ambientes naturais, essas bactérias podem passar por processos de mutação espontânea que as levam a adquirir características diversas ao acaso. Essas características podem ser benéficas, neutras ou prejudiciais à sobrevivência e reprodução da bactéria. Porém, em vista da pressão seletiva exercida pelo meio, as características mais vantajosas para a bactéria são selecionadas e reproduzidas nas novas gerações, conforme a colônia cresce (Manyi-Loh, 2017).

Quando o meio exercendo pressão seletiva é um paciente humano recebendo drogas antibióticas, o resultado é a seleção das bactérias que possuem mecanismos capazes de resistir ao antibiótico a qual elas estão sendo expostas. Essas bactérias então se reproduzem, tornando a infecção resistente ao tratamento e, portanto, mais perigosa para o paciente. Por exemplo, algumas bactérias podem apresentar mutações que alteram suas proteínas ligantes à penicilina, o que acaba por reduzir sua ação, e, portanto, caracteriza resistência a este fármaco. Caso essa mutação ocorra em um ambiente em que um paciente está tomando penicilina, esta seria uma característica vantajosa que poderia então ser selecionada, gerando toda uma população de bactérias resistentes a este antibiótico (Blair, 2015).

Este cenário é preocupante pela frequência com que estes medicamentos são prescritos, muitas vezes desnecessariamente, além do uso indevido feito pelos pacientes, o que propicia condições favoráveis para o surgimento de superbactérias. Além disso, o uso exagerado de antibióticos na indústria agropecuária, que visa manter a saúde dos animais em fazendas de larga escala e de alta produtividade, pode levar ao surgimento de superbactérias,

que posteriormente podem vir a infectar humanos (Summers, 2006; Collignon, 2019; Pendleton, 2013).

Outros mecanismos de resistência incluem, mas não se limitam à: alteração na permeabilidade da membrana, impedindo que haja contato do antibiótico com o seu alvo de ação; inativação do antibiótico por modificação ou degradação enzimática; alteração do sítio de ligação com o antibiótico e efluxo das moléculas antibióticas para fora da bactéria (Kapoor, 2017).

Além da resistência intrínseca de determinado antibiótico vinda de mutações nos cromossomos e passadas adiante hereditariamente para as subseqüentes gerações de bactérias, também pode ocorrer a transferência horizontal de genes através de um dos processos de transformação, transdução e conjugação. Através desses mecanismos, resistências antibióticas podem ser passadas entre populações de bactérias, mesmo entre as que possuem relação taxonômica distante entre si. A transferência por transformação tem início quando a bactéria doadora libera uma parte de seu DNA, seja intencionalmente como parte do seu ciclo celular, ou não intencionalmente, quando a célula sofre lise, e pode ser englobado por bactérias adjacentes e utilizado ou para nutrição ou então passa a integrar o genoma da bactéria receptora através de recombinação homóloga (Burmeister, 2015)

O processo de transformação depende da proximidade taxonômica das bactérias doadoras e receptoras, uma vez que fragmentos não homólogos não poderiam se recombinar. O processo de transdução, por sua vez, ocorre mediado por vírus bacteriófagos que se integram ao material genético do hospedeiro e o levam a outro hospedeiro quando eles se replicam, alterando seu DNA. Desta forma, é possível que um bacteriófago carregue um gene de resistência antibiótica de uma bactéria para outra (Summers, 2006)

Outro método de transferência horizontal, a conjugação, ocorre através da transferência de fragmentos, costumeiramente circulares, de DNA de fita dupla denominados plasmídeos, que podem passar uma única fita do seu DNA da bactéria doadora para a receptora através de uma estrutura denominada pilus, ou então ser inteiramente transferido e se replicar no plasma celular do seu receptor da mesma forma que fazia no doador, devido ao seu caráter auto replicante. Desta forma, os plasmídeos podem conferir expressão de moléculas distintas das que ocorrem naturalmente na bactéria receptora, incluindo aquelas que conferem resistência a antibióticos (Soucy, 2015).

2.2 ESKAPEE

O acrônimo ESKAPEE é formado pelos nomes científicos de sete bactérias:

Enterococcus faecium, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter sp.* e *Escherichia coli* (Mulani, 2019; Mahmood, 2016).

Esse grupo é composto tanto de bactérias Gram Negativas, quanto Gram Positivas e é considerado de alta relevância médica por ser altamente virulento e patogênico devido a sua elevada resistência a múltiplas drogas (MDR), incluindo antibióticos (Mulani, 2019; Santajit 2016).

As ESKAPEE são tidas como oportunistas, pois são encontradas naturalmente no ambiente (solo, água) e também na microbiota humana e de outros animais, mas podem causar infecções direta ou indiretamente em pacientes hospitalizados, através da contaminação de superfícies, objetos e das mãos (CDC, 2019; Santajit, 2016; Taylor, 2020).

A resistência a antibióticos deste grupo se dá principalmente pelo uso incorreto e exacerbado de antibióticos nos setores clínico, animal e da agricultura (Collignon, 2019). Em especial, quando doses sub-ótimas são prescritas ou quando os pacientes não seguem o tratamento de forma adequada, cepas de bactérias resistentes podem ser naturalmente selecionadas. Essa resistência pode ser também transmitida horizontalmente a outros patógenos, o que é especialmente relevante em ambientes hospitalares, onde as bactérias são constantemente expostas a antibióticos e podem compartilhar resistências com aquelas que ainda não as desenvolveram (Pendleton, 2013).

2.2.0 *Enterococcus faecium*

As *Enterococcus faecium* são bactérias Gram positivas do gênero *Enterococcus* comumente encontradas no trato gastrointestinal de humanos e de outros animais (Ryan, 2004; Willem, 2017). Geralmente, essas bactérias são inócuas e coexistem como parte da microbiota de outros organismos, porém, também podem ser patogênicas e estão relacionadas a doenças como meningite e endocardite. Além disso, podem causar infecções sanguíneas e do trato urinário, em especial as infecções decorrentes de feridas causadas por cirurgias e pelo uso de catéteres, devido a sua capacidade de formar biofilmes (Mascini, 2006; Mahmood, 2016).

As *E. faecium* patogênicas desenvolveram resistência antibiótica a múltiplas drogas, mas existem cepas especialmente resistentes à vancomicina (Agudelo, 2014; Mascini, 2006).

2.2.1 *Staphylococcus aureus*

As *Staphylococcus aureus* são bactérias Gram positivas do filo *Bacillota* comumente encontradas no trato respiratório superior e na pele. Embora essas bactérias sejam parte da

microbiota humana, elas podem se tornar patógenos oportunistas, infectando principalmente feridas na pele e as vias respiratórias, causando pneumonia e sinusite (Masalha, 2001; Schenk, 2016; Mahmood, 2016).

As *S. aureus* produzem uma série de enzimas que auxiliam na resistência a drogas, como a beta-lactamase, além de diversas exotoxinas relacionadas a doenças como a síndrome do choque séptico (Dinges, 2000; Pendleton, 2013). Assim como as *E. faecium*, elas também são capazes de produzir biofilmes, o que faz com que elas possam se aderir a implantes médicos e cosméticos (Archer, 2011).

2.2.2 *Klebsiella pneumoniae*

As *Klebsiella pneumoniae* são bactérias Gram negativas do tipo bacillus comumente encontradas no solo e na microbiota da boca, pele e intestinos humanos. Quando inaladas, podem causar pneumonia, mas também estão relacionadas a infecções sanguíneas e do trato urinário. Devido a sua capacidade de formar biofilmes, também podem se aderir a implantes médicos, sendo especialmente responsáveis por pneumonias associadas ao uso de ventiladores. Porém, o biofilme também faz com que ela seja resistente a fagócitos, pois ele permite que elas se grudem fortemente a outras células. (Pendleton, 2013; Postgate, 1998; Mahmood, 2016)

Além disso, as *K. pneumoniae* são especialmente capazes de realizar transferência horizontal de genes conferindo adaptabilidade adicional (Pendleton, 2013).

2.2.3 *Acinetobacter baumannii*

As *Acinetobacter baumannii* são bactérias Gram negativas do tipo *coccobacillus* encontradas quase que exclusivamente em ambientes hospitalares, o que resultou no desenvolvimento de resistências a todo tipo de antibióticos conhecidos. Elas são capazes de sobreviver em diferentes condições de pH, temperatura, níveis de nutrientes e umidade, além de produzirem biofilme, o que permite que se fixem em superfícies artificiais por longos períodos de tempo (Lin, 2014; Pendleton, 2013; Espinal, 2012).

As principais doenças causadas por *A. baumannii* são infecções sanguíneas, em feridas e pneumonias associadas ao uso de ventiladores. No geral, elas oferecem baixo risco a pacientes saudáveis, porém, podem trazer problemas graves para aqueles portadores de doenças crônicas e imunodeficiências (Mahmood, 2016; CDC, 2017).

2.2.4 *Pseudomonas aeruginosa*

As *Pseudomonas aeruginosa* são bactérias Gram negativas do tipo *bacillus* encontradas no solo, na água, na microbiota da pele. Além de conseguirem sobreviver na

maioria dos ambientes criados por humanos, elas também são capazes de colonizar ambientes extremos, podendo se agregar em biofilmes duradouros. Embora sejam consideradas de menor virulência quando comparadas a outras ESKAPEE, as *P. aeruginosa* apresentam risco elevado tanto para pacientes saudáveis, quanto para imunocomprometidos, assim como também podem causar doenças em plantas e outros animais (Pendleton, 2013; Diggle, 2020; Høiby, 2010).

As *P. aeruginosa* possuem alta resistência a antibióticos e são consideradas organismos modelo em estudos destes. Essas bactérias sobrevivem especialmente bem no pulmão de portadores de fibrose cística, causando pneumonia, mas também estão relacionadas a infecções sanguíneas e do trato urinário (Pendleton, 2013; Cornelis, 2008; Mahmood, 2016).

2.2.5 *Enterobacter spp*

Enterobacter é um gênero de bactérias Gram negativas do tipo *bacillus* pertencentes ao grupo dos coliformes. Diversas cepas de *Enterobacter* são patógenas oportunistas, principalmente em pacientes hospitalizados e causam infecções do trato urinário, sanguíneas e podem fixar-se a implantes médicos, como cateteres. (Adeolu, 2016; Mahmood, 2016).

Atualmente, existem poucos antibióticos disponíveis que sejam eficazes no tratamento dessas bactérias, sendo a colistina e a tigeciclina alguns deles (Pendleton, 2013).

2.2.6 *Escherichia coli*

As *Escherichia coli* são bactérias do tipo *bacillus* pertencentes ao grupo dos coliformes que geralmente são encontradas na microbiota intestinal. Geralmente, elas são inócuas, ou até mesmo benéficas para os organismos hospedeiros, mas existem cepas patogênicas, que podem causar desde intoxicação alimentar e diarreia, até infecções sanguíneas, do trato urinário, de locais de cirurgia e pneumonia (Martinson, 2020; Mahmood, 2016).

O tratamento de infecções por *E. coli* através de antibióticos se mostrou eficaz, mas geralmente não é recomendado, devido à crescente resistência a múltiplas drogas por essas bactérias (CDC, 2016).

3. Biofilmes bacterianos

Dentre todos os biofilmes microbianos, os mais estudados e publicados são os biofilmes bacterianos. Com a sua formação, as bactérias encontraram um mecanismo eficiente para se proteger de agentes externos e se proliferar, aumentando sua resistência a antibióticos e sua taxa de sobrevivência, fazendo com que as colônias se tornem cada vez mais resilientes. Estes biofilmes estão associados com até 80% das infecções bacterianas hospitalares e nos

casos de infecções mais persistentes ao tratamento com antibióticos (Mirzaei, 2020). Estas colônias possuem em comum a produção de uma extensa matriz extracelular, porém, a composição de cada uma varia muito de espécie para espécie, inclusive alguns estudos mostram que não somente a proporção de cada nutriente pode variar de cepa para cepa (Luan, 2020), como também, em alguns casos, a identidade do principal polissacarídeo. A variedade entre os biofilmes bacterianos é tamanha que até mesmo seu processo de formação e maturação se difere entre as espécies (Stoodley, 2002). O que leva os estudos a serem bem específicos, portanto muita informação de alguns mecanismos ainda precisa ser documentada.

3.1 Formação do Biofilme

O biofilme bacteriano não difere do biofilme dos demais micróbios no que se refere a sua formação geral, apesar de algumas especificidades, continua ocorrendo em cinco passos. A primeira fase consiste na adesão inicial das células a uma superfície e esse processo pode ocorrer devido a forças Brownianas e/ou gravitacionais, hidrodinâmica, ou então meramente por acaso. Nesta etapa, as células estão envoltas por uma pequena quantidade de EPS, portanto ainda estão em uma “fase reversível”, isto é, elas ainda são capazes de se movimentar de forma independente e podem se desafixar e voltar a um modelo planctônico, como comumente acontece (Stoodley, 2002; Dunne, 2002). A partir dessa fase de formação, se torna visível como a especiação altera os mecanismos de formação do biofilme. Um bom exemplo é a *E. coli*, que por ser uma bactéria flagelada possui certa motilidade e, portanto, consegue se opor a forças eletrostáticas e hidrodinâmicas encontradas perto de superfícies, o que favorece o seu contato com elas (Wood *et al.*, 2006). Essa mesma motilidade também permite a visualização das características da fase reversível, pois ela favorece o processo de desprendimento da superfície (Dunne, 2002). O próximo estágio de formação do biofilme só tem início uma vez que as células se estabilizam na superfície e comecem a produzir EPS suficiente para que possam se aderir de forma irreversível (Characklis, 1990). Situação que é altamente influenciada pelos fatores bioquímicos da superfície e do substrato como por exemplo pH, temperatura, rugosidade e características hidrofílicas se provaram em diversos experimentos essenciais para a uma maior força de adesão das células ou para criar condições em que a célula produza ou altere a composição de sua EPS (Beloin, 2008).

A segunda fase é a “irreversível”, na qual as células se aderem completamente à superfície e agora começam a produzir mais de sua EPS (Verderosa, 2019). Essa aderência é atingida através de múltiplas interações da superfície celular bacteriana com o meio: ligações covalentes, iônicas, e de hidrogênio juntamente com suas características hidrofóbicas (Zhao,

2013). Outros mecanismos responsáveis pela aderência ao substrato são estruturas próprias de adesão que se encontram na superfície celular. Essas estruturas que auxiliam na segunda fase também apresentam uma alta especificação, ou seja, vários biofilmes possuem mecanismos diferentes de utilizá-las para a fixação (Stoodley, 2002). O início da produção da EPS também é importante para esta fase. Além da aderência conferida pelos polímeros da EPS, existem diversas adesinas, componentes de superfície celular bacteriana que facilitam a aderência delas à outras células e biofilmes e, portanto, tem função vital no biofilme, como por exemplo alguns tipos de pili, flagelos e eDNA (Donlan, 2002; Beloin, 2008). Exemplos dessas proteínas nas ESKAPEE são: a amplamente documentada *P. aeruginosa* que possui uma organela em formato de microfibrila proteica pilus tipo IV que além de ajudar em manter a aderência tem papéis importantes documentados na motilidade em superfície da célula o que leva a se encontrar a outras e, aumentar então a adesão do biofilme como um todo (Stoodley, 2002). Já por exemplo a *E.coli* possui os pili tipo 1 que através de interações com a manose de oligopolissacarídeos de células eucarióticas consegue se aderir a elas, diversas pesquisas entretanto sugerem que essa mesma organela é ativada de forma não específica na ligação desta bactéria a superfícies abióticas., provando a importância e a variedade das estruturas de adesão na superfície celular de cada espécie bacteriana nesta etapa (Beloin, 2008).

Existem outros fatores envolvidos na segunda fase de formação de biofilmes bacterianos. A EPS secretada também possui diversos componentes capazes de corroborar com a migração da fase reversível para fazer irreversível. Um deles é o DNA extracelular (eDNA) cuja obtenção se dá principalmente através da lise de células-mãe e é controlado por quórum (quórum sensing, QS) e mediado por hidrolases ou autolisinas, enzimas que, dentre outras funções, também são responsáveis pela lise bacteriana (Thi, 2020; Fleming 2017). O eDNA é responsável desde a estabilização da matriz celular até a adesão à superfícies e aderência intercelulares (Flemming, 2010; Aldecoa *et al.*, 2017). Em um estudo em que foi identificada a principal autolisina da *E.faecium*, foi visto que ela era importante para a formação do biofilme e também propiciava interações intercelulares, sugerindo alvejar essa autolisina em tratamentos para esse tipo de infecção (Paganelli, 2013). Ainda sobre a importância da EPS nesse estágio, existe uma alta quantidade de PSs que colaboram e/ou possuem um grande impacto nessa segunda fase, desde a adesão à superfície até a agregação entre as bactérias (Limoli, 2015).

No terceiro estágio o biofilme já está fixado e começa a sintetizar e secretar uma maior quantidade de EPS. Nesta fase o seu aumento de secreção auxilia ainda mais na adesão como mencionado anteriormente, tornando o biofilme mais resistente a fatores externos que

poderiam desprendê-lo. Essa extensa secreção é o que define os biofilmes, afinal, o invólucro de EPS em volta da colônia é o que diferencia um biofilme de uma simples colônia de bactérias ligada a uma superfície (Stoodley 2002).

Após secretar o suficiente para se proteger de agentes externos, o biofilme adentra o quarto estágio. O estágio de maturação é onde as células bacterianas começam a se multiplicar dentro da matriz extracelular, durante esse processo ocorre uma alteração drástica no perfil de expressão gênica das células tornando-as diferentes das populações celulares que vivem em vida planctônica (Rollet, 2008). Essa mudança na expressão gênica é influenciada por diversos fatores como o substrato, o pH, a temperatura e o meio. Portanto a composição da matriz extracelular passa a ser diferente não só em espécies distintas de bactérias, mas também podem ser diferenciadas entre cepas de mesma espécie, variando também de acordo com a forma de cultivo e maturação (Stoodley, 2002; Rollet, 2008; Thi, 2020). A diferença nessa expressão é tão grande que um estudo que escolheu a *P.aeruginosas* como alvo constatou diferente expressão proteica em quatro estágios de formação do biofilme, observando uma alteração relevante na concentração de proteínas em todas as fases (Sauer, 2002). O biofilme então começa a criar micro colônias e canais de água que atuam como uma rede de transmissão de nutrientes tanto sintetizados quanto obtidos do meio para toda a colônia (Donlan, 2002). Após ganhar tamanho e forma suficientes para atingir um estado tridimensional, o biofilme atinge o quarto estágio, quando está completamente maturado, tornando-se um desafio maior para tratamentos clínicos devido à proteção conferida pela matriz extracelular à ação antibiótica (Ito *et al*, 2009). Nesse estágio, estratégias terapêuticas que normalmente são utilizadas para combater e impedir a formação de biofilmes não são mais eficazes, e torna-se necessário começar a cogitar estratégias para a degradação da matriz extracelular (Ramakrishnan *et al*, 2022).

A quinta fase se inicia após a maturação completa do biofilme, e é caracterizado pela formação de microcolônias que se desprendem da matriz extracelular e vão infectar outro meio, reiniciando assim o seu ciclo de vida (Stoodley, 2002). Esse espalhamento pode ser causado por muitos fatores, sejam eles externos ou internos, passivos ou ativos. A dispersão passiva ocorre quando fatores externos ao próprio biofilme o forçam a ter partes suas desprendidas, como por exemplo colisões. Enquanto dispersão ativa se refere a mecanismos internos do próprio biofilme que libera micro colônias como uma forma de resposta a mudanças no ambiente, como por exemplo mudança na concentração de nutrientes do meio, exposição a agentes microbianos ou enzimas que degradam a matriz extracelular (Kaplan, 2010).

Com estes fatores em mente, torna-se evidente a importância das substâncias poliméricas extracelulares (EPS) em todas as fases de formação do biofilme. Atuando desde a fixação inicial das células até a sua estabilização e por fim proteção da colônia (Limoli, 2015; Fleming, 2017).

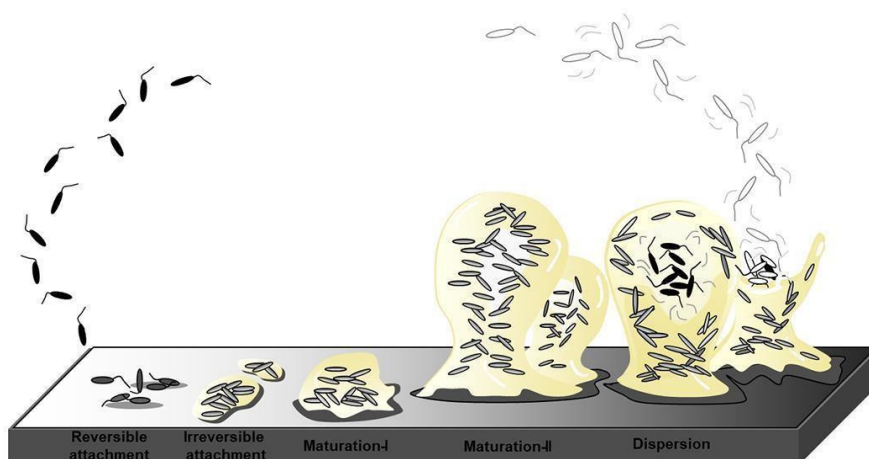


Figura 2 - Esquema didático das 5 fases de formação de um biofilme bacteriano: (I) Adesão inicial e reversível, (II) adesão irreversível e início da produção de EPS, (III) início do estágio de maturação com intensa secreção de EPS formando a matriz extracelular, (IV) biofilme maturado, (V) dispersão do biofilme, liberando microcolônias para a vida livre de forma a colonizar novas superfícies. FONTE: Sauer *et al*, 2022.

3.2 Componentes principais dos biofilmes de ESKAPEE

Com a importância das EPS bem estabelecida na literatura, torna-se necessário compreender quais são as principais substâncias encontradas em biofilmes de ESKAPEE para que seja permitido o estudo de sua degradação enzimática e futuro combate antimicrobial (Flemming, 2010; Ramakrishnan, 2022; Fleming, 2017). A Tabela 1 sintetiza as principais EPS de cada membro desse grupo de bactérias.

ESKAPEE	Principais EPS
<i>Enterococcus faecium</i>	Ligações de açúcares, ácido urônico
<i>Staphylococcus aureus</i>	PIA, Bap, eDNA
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	PNAG
<i>Acinetobacter baumannii</i>	PNAG, Bap
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Alginato, Pel, Psl

<i>Enterobacter spp</i>	Ácido colânico
<i>Escherichia coli</i>	Celulose, PAG, ácido colânico

Tabela 1 - Compilação de substâncias extracelulares importantes para o biofilme das ESKAPEE de acordo com a literatura trazida neste trabalho

3.2.0 *Enterococcus faecium*

Não foram encontrados estudos suficientes acerca da composição específica dos principais componentes de biofilmes de *E. faecium*, entretanto, Arar *et al.* (2022) realizaram uma pesquisa que evidenciou não só uma alta composição de açúcares na EPS, como esperado de biofilmes bacterianos, como também uma alta concentração de ácido urônico, sugerindo-o como possível alvo de degradação. Esta substância faz parte da composição do alginato e do ácido colânico que por sua vez estão presentes em biofilmes de outras ESKAPEE.

3.2.1 *Staphylococcus aureus*

Diferentemente de outras espécies de biofilmes que possuem múltiplos polissacarídeos importantes em sua EPS, esta possui apenas um majoritário. O principal PS que compõe a *S. aureus* é a adesina polissacarídica intercelular (PIA). PIA é um nome dado devido a sua função homônima e apresenta composição semelhante a da poli- β -1-6-N-acetilglucosamina (PNAG), substância vital em diversos biofilmes. Outro componente importante, mas amplamente presente em diversos biofilmes é o eDNA, cuja importância na *S. aureus* será mencionada posteriormente, e uma enorme variedade de proteínas de superfície celular. Um dos exemplos mais estudados dessa proteína é a família de proteínas associadas ao biofilme (Bap) (Archer *et al.*, 2011; Idrees *et al.*, 2021).

3.2.2 *Klebsiella pneumoniae*

Assim como a *S. aureus*, a *K. pneumoniae* possui a PNAG como principal componente da EPS. O que é comum entre biofilmes bacterianos dado a importância do PIA/PNAG para a vida dessas colônias (Li, 2023).

3.2.3 *Acinetobacter baumannii*

Esse biofilme também apresenta um dos componentes da matriz extracelular mais famosos já mencionados, PNAG. Essa bactéria curiosamente possui também a mesma família de proteínas de membrana externa descoberta no biofilme de *S. aureus*, Bap (Gedefie, 2021).

3.2.4 *Pseudomonas aeruginosa*

Uma das bactérias produtoras de biofilmes mais estudada (Tuon, 2022), a

Pseudomonas aeruginosa possui três principais exopolissacarídeos importantes na produção de biofilme. Sendo eles o alginato, Pel e Psl (Thi, 2020).

3.2.5 *Enterobacter spp*

Não foram encontrados estudos suficientes acerca da composição específica dos principais componentes de biofilmes do gênero *Enterobacter*. O que pode ter ocorrido pela variedade de substâncias que existem nas matrizes extracelulares de diferentes espécies de bactérias. Entretanto, Ramakrishnan *et al.* (2022) citam o ácido colânico como um dos principais componentes do biofilme de *Enterobacter spp*.

3.2.6 *Escherichia coli*

A *E. coli* também apresenta os polissacarídeos PNAG (comumente chamado de PAG na *E. coli*) e o ácido colânico. Porém o seu diferencial em relação a outras ESKAPEE está em um dos PS mais numerosos do mundo, a celulose (Beloin, 2008).

4. EPSs e enzimas que as degradam

4.1 PNAG

A PNAG é o nome dado a poli- β -1-6-N-acetilglucosamina (β -1,6-GlcNAc), ela é um polissacarídeo de superfície amplamente presente em biofilmes bacterianos, e será abordado primeiro devida a sua repetida aparição nas ESKAPEE. Este PS possui diversas formas de acordo com a literatura, mas por mais que varie de acordo com o grau de N-desacetilação e O-succinilação, já foram comprovados se tratar do mesmo polímero. Um exemplo disso é que o PNAG também é nomeado poliglucosamina (PGA) em bactérias gram-negativas por não possuírem os mecanismos necessários para a O-succinilação (Izano *et al.*, 2008; Arciola *et al.*, 2015; Yakandawala *et al.*, 2011; Limoli, 2015).

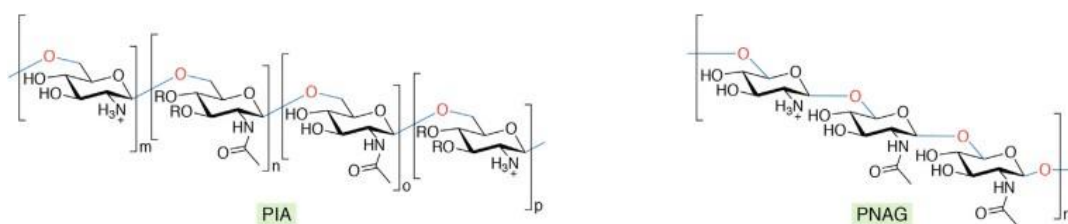


Figura 3 - Poli- β -1-6-N-acetilglucosamina em duas formas comuns, onde a pequena diferença na estrutura se dá pela falta de mecanismos para realizar a O-succinilação na PNAG. FONTE: Ramakrishnan *et al.* 2022

Por ser muito estudado, esse PS possui funções e capacidades bem estabelecidas. Sua primeira atuação é como intermediador de interações celulares cujas quais apoiam a adesão ao biofilme. Outra importante atuação é na agregação intercelular, onde ao estudar a PNAG da *S. aureus* foi descoberto que em cepas que não produziam PIA o biofilme ainda era formado,

porém não possuía as múltiplas camadas características da fase de maturação (Archer *et al.*, 2011; Arciola *et al.*, 2015; Limoli, 2015).

É possível encontrar múltiplos estudos acerca de sua degradação enzimática, sendo a mais mencionada a Dispersina B. Essa enzima é uma β -hexosaminidase que foi descoberta sendo produzida pela bactéria *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* e é uma hidrolase glicosídica, ela degrada a PNAG através da clivagem de ligações $\beta(1,6)$ (Ramasubbu, 2005; Breslawec, 2023). A Dispersina B se mostrou capaz de degradar os biofilmes de todas as ESKAPEE que contêm PNAG (Jiang, 2020). Um estudo demonstrou que existe também outra enzima capaz desse mesmo feito: a PgaB é uma enzima com função dupla de carboidrato esterase e hidrolase glicosídica. Sendo que este último domínio mostrou eficácia na atuação em PNAGs parcialmente desacetiladas, quebrando biofilmes dependentes dela (Little *et al.*, 2018).

4.2 Alginato, Pel, Psl

A alginato é um polímero acetilado de múltiplas proporções de ligações 1,4 entre β -D-ácidos manurônicos e o α -L-ácidos gulurônicos, cujas quais podem alterar na forma do biofilme (Boyd, 1995; Thi, 2020). Ele é super produzido em cepas mucosas da *P. aeruginosa* e tem múltiplas atuações importantes como aumento da resistência do biofilme contra antibióticos, através de difusão destes e na etapa de maturação (Thi, 2020). Apesar disso algumas pesquisas demonstraram que a alginato não é essencial no biofilme de *P. aeruginosa*, embora possua uma característica interessante em sua arquitetura, cuja qual cepas que não possuíam alginato passaram a apresentar uma configuração mais plana (Stapper, 2004; Wozniak, 2003).

A enzima amplamente utilizada para degradação da alginato é a homônima alginato-liase. Essa enzima age através da quebra de ligações glicosídicas entre os monômeros do PS, sendo o mecanismo de ativação a reação de β -eliminação. A utilização da alginato-liase em conjunto com a administração de antibióticos em biofilmes de *P. aeruginosa* que possuem alginato se provou um método eficaz para a sua destruição (Daboor, 2021).

Em cepas não mucosas, entretanto, *P. aeruginosa* produz uma quantidade menor de alginato e portanto seus principais polissacarídeos passam a ser então o Pel e o Psl. Existem estudos que mostram que a síntese desses PS é específica de cepa para cepa e apresentam funções semelhantes visto que em variantes onde um deles não era produzido, o biofilme ainda era produzido de forma funcional (Colvin, 2012). A estrutura do Pel foi demonstrada em uma pesquisa recente como um polímero composto majoritariamente por repetições de

ligações α -1,4 entre galactosaminas e N-acetilgalactosaminas (Le Mauff, 2022). Enquanto a estrutura do Psl é um pentasacarídeo contendo os monossacarídeos D-glucose, D-manose e L-Ramnose. A função em cada etapa de formação de biofilme de ambos altera conforme as bactérias e cepas em que estão presentes, atuando desde a etapa inicial de adesão até a maturação e na resistência do biofilme (Yang, 2011).

Psl e Pel são degradados pelas respectivas enzimas hidrolases glicosídeas: PslG e PelA (Yu, 2015; Baker, 2016), que apesar de estarem envolvidas na síntese do biofilme, também podem ser utilizadas para a sua quebra. Outras hidrolases glicosídicas também se apresentaram capazes de degradar os biofilmes de *P. aeruginosa*, sendo elas a α e β -manosidase atuando nos campos de ligação da manose (Banar, 2016).

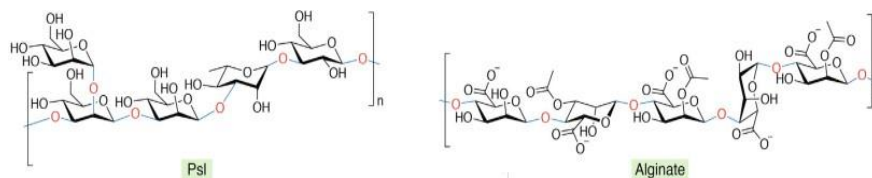


Figura 4 - Estrutura química dos polissacarídeos Psl e Alginato. FONTE: Ramakrishnan *et al.* 2022

4.3 Celulose

A celulose é o biopolímero mais comum no mundo (McNamara, 2015) e também está presente em biofilmes bacterianos, sendo a *E. coli* o exemplo mais famoso. Esse PS nas bactérias possui a mesma estrutura de quando aparece na parede celular das plantas e é composto por ligações β -1,4 de D-glicopirranose. Estudos já comprovaram que a celulose possui tanto funções estruturais como de proteção do biofilme. Por exemplo, Serra (2013) mostrou que a combinação de celulose com outros materiais na matriz do biofilme forneceu ambas as características apontadas de forma eficiente, confirmando estudos anteriores em que a matriz de Salmonella resistiu até mesmo a ação da celulase.

F. Cellulose

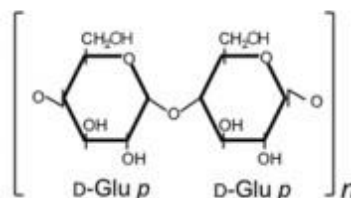


Figura 5 - Estrutura química da celulose encontrada no biofilme.FONTE: Limoli, 2015

A celulase é uma enzima conhecida por degradar esse PS. Ela é uma hidrolase glicosídica que hidrolisa ligações β -1,4 que são comuns em biofilmes bacterianos, tornando ela uma enzima não só capaz de degradar a celulose, mas também outras EPS que apresentem

essas ligações (Fleming *et al.*, 2016; Lim *et al.*, 2019).

4.4 Ácido colânico

Ácido colânico é um polissacarídeo ramificado, composto pela junção de glucose, fucose, galactose e ácido glucurônico. Em diversas espécies da família *Enterobacteriaceae* a produção de ácido colânico é mediada por um conjunto de 19 genes que podem ser estimulados por uma cascata de fosforilação, que induz um aumento na transcrição de ácido colânico. Isto ocorre especialmente como uma resposta frente a estresses ambientais como desidratação, desequilíbrio osmótico e baixas temperaturas, auxiliando o biofilme a sobreviver durante o período de vida anterior à infecção de um hospedeiro. Além disso, a função do ácido colânico também está associada com a arquitetura do biofilme, ajudando a conferir forma e estrutura. Como demonstrado em experimentos, a ausência da produção de ácido colânico pode ocasionar no achatamento do biofilme, que perde sua conformação tridimensional e compactando as células com o colapso da estrutura do do mesmo. Isto também pode explicar por que a produção de ácido colânico se mantém mesmo posteriormente a maturação do biofilme (Beloin, 2008; Limoli, 2015)

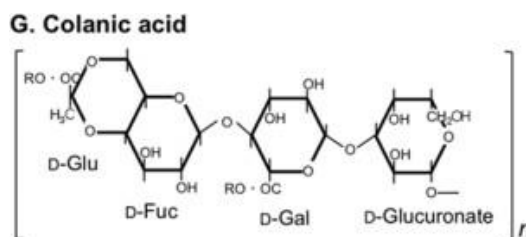


Figura 6: Estrutura química do ácido colânico. Fonte: Limoli, 2015

Um estudo foi capaz de isolar uma nova enzima com função hidrolítica capaz de clivar a ligação entre duas porções residuais de fucopiranosil, portanto esta proteína é classificada como uma hidrolase de 1,4- β fucosídeo e é capaz de degradar ácido colânico em fragmentos bem menores do que as enzimas anteriormente conhecidas como as descritas por Sutherland *et al* em 1971, que apenas rompiam as ligações entre fucose e glicose e Speybroeck *et al* em 1996 que não reduzia tanto o peso molecular do ácido colânico degradado (Verhoef, 2005).

4.5 Bap

Diferentemente das últimas substâncias mencionadas, o grupo Bap não são polissacarídeos. O termo se refere a uma família de proteínas associadas ao biofilme e foi descoberto que elas mediam ligações à superfícies abióticas e favorecem a adesão intercelular, permitindo a formação do biofilme (Latasa *et al.*, 2006; Archer *et al.*, 2011). Lasa (2006) observou que Bap permitia a formação do biofilme em cepas de *Staphylococcus*, mesmo que

não apresentassem a produção exacerbada de PIA, mostrando sua importância na fase de formação do biofilme.

Como proteínas são componentes essenciais da EPS, a utilização de proteases para degradação de biofilmes bacterianos também é um método eficaz para destruir o biofilme (Fleming, 2017). Shukla e Rao (2013) demonstraram em seus estudos o efeito da Proteinase K em cepas do biofilme de *S. aureus*, onde conseguiram dispersar com sucesso o biofilme em cepas menos dependentes de PIA, corroborando pesquisas anteriores que sugeriram a degradação do biofilme através do uso de Dispersina B seguida pela proteinase K (Chaignon, 2007; Lim *et al.*, 2019).

4.6 eDNA

DNA extracelular (eDNA) é um componente importante, apesar de inesperado, da matriz dos biofilmes. Em um primeiro momento, acreditou-se que a presença de DNA na matriz dos biofilmes era meramente residual de outros organismos presentes no biofilme que teriam morrido. Porém a presença de DNA extracelular na matriz é proposital e é benéfica ao biofilme e se deve a processos de autólise celular que podem ocorrer tanto por ‘fratricídio’ celular, em que a população do biofilme se divide em subpopulações de atacantes e alvos, resultando na destruição de células alvo e consequentemente na exposição do seu DNA a matriz extracelular, ou então por ‘suicídio altruísta’ onde a célula se autodestrói pelo bem da comunidade do biofilme similar ao processo de apoptose de células eucarióticas (Montanaro, 2011)

Quanto a função dessas moléculas, foi observado sua importância nos estágios iniciais de adesão do biofilme na superfície em que ele está escorado e posteriormente sua função e importância na estruturação do biofilme durante os momentos de maturação (Alhede, 2020).

Outra função das moléculas de eDNA é a transferência horizontal de genes, a troca de informação genética entre bactérias aumentando a chance de que alguma mutação benéfica ao biofilme se propague. Em um ambiente com muitas pressões seletivas, como vírus e antibióticos, ele auxilia o biofilme a espalhar características de resistências entre os seus habitantes, promovendo maior dificuldade no tratamento (Montanaro, 2011).

Uma estratégia para decompor o biofilme é fazer uso de desoxirribonucleases, que possuem uma ação comprovada ao impedir a adesão deste e a sua maturação nos primeiros estágios de seu ciclo (Flemming, 2017). No entanto, a ação das enzimas que clivam o eDNA também é efetiva em biofilmes já estabelecidos em casos específicos, por exemplo a enzima Estreptodornase desmantela o biofilme já estabelecido de *P. aeruginosa* e a enzima

pancreática DNase I é eficaz contra uma ampla gama de biofilmes bacterianos (Nemoto *et al.*, 2003; Tetz & Tetz, 2010; Sharma & Singh, 2018).

EPS	Enzimas degradativas
PNAG	Dispersina B, PgaB
Alginato	Alginato-liase, celulase
Pel	PelA
Psl	PslG, α e β -manosidases
Celulose	Celulase
Ácido colânico	1,4- β -fucosideo hidrolase
Bap	Proteinase K
eDNA	Estreptodornase, DNase I

Tabela 2 - Reúne as informações citadas nesta seção acerca das principais EPS presentes nas ESKAPEE e quais enzimas são conhecidas por degradá-las

5. CONCLUSÃO

Neste trabalho apurou-se referências bibliográficas das características de formação, desenvolvimento e funções acerca de biofilmes bacterianos. Assim como foi demonstrado a periculosidade das ESKAPEE, o que torna necessário uma atenção especial no tratamento de suas infecções e combate.

A técnica de degradação enzimática dos biofilmes foi observada como uma ferramenta já amplamente estudada e fundamentada para combate à essas bactérias *in vitro*. Por mais que ainda falte informação acerca de algumas das ESKAPEE, já existem múltiplas enzimas pesquisadas para o combate aos seus biofilmes. Por conta da composição da EPS a estratégia mais utilizada na degradação do biofilme foca na lise dos polissacarídeos da matriz extracelular, mas a degradação via proteases e DNases também se mostraram eficazes.

Espera-se que mais estudos e pesquisas acerca da composição da EPS das ESKAPEE sejam realizados para que cada vez mais se aproxime a oportunidade de combate a essas

colônias em seu estado já maturado e *in vivo* sem risco para os pacientes.

REFERÊNCIAS

***Acinetobacter* in Healthcare Settings.** Centers for Disease Control and Prevention. US Department of Health and Human Services. Retrieved 18 April 2017.

ALHEDE M, ALHEDE M, QVORTRUP K, KRAGH KN, JENSEN PØ, STEWART PS, BJARNSHOLT T. **The origin of extracellular DNA in bacterial biofilm infections in vivo.** Pathog Dis. 2020.

ARCHER, N. K., MAZAITIS, M. J., COSTERTON, J. W., LEID, J. G., POWERS, M. E., & SHIRTLIFF, M. E. ***Staphylococcus aureus* biofilms: properties, regulation, and roles in human disease.** Virulence, 2011

ARCIOLA CR, CAMPOCCIA D, RAVAIOLI S, MONTANARO L. **Polysaccharide intercellular adhesin in biofilm: structural and regulatory aspects.** Front Cell Infect Microbiol. 2015

BALCHT A, SMITH R (1994). ***Pseudomonas aeruginosa: Infections and Treatment.*** Informa Health Care. pp. 83–84. ISBN 978-0-8247-9210-7

BANAR, M.; EMANEINI, M.; SATARZADEH, M.; ABDELLAHI, N.; BEIGVERDI, R.; LEEUWEN, W.B.; JABALAMELI, F. **Evaluation of mannosidase and trypsin enzymes effects on biofilm production of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from burn wound infections.** PLoS ONE 2016

BAKER-AUSTIN, C. **Life in acid: pH homeostasis in acidophiles.** Trends in Microbiology, 2007

BAKER P, HILL PJ, SNARR BD, ALNABELSEYA N, PESTRAK MJ, LEE MJ, JENNINGS LK, TAM J, MELNYK RA, PARSEK MR, SHEPPARD DC, WOZNIAC DJ, HOWELL PL. **Exopolysaccharide biosynthetic glycoside hydrolases can be utilized to disrupt and prevent *Pseudomonas aeruginosa* biofilms.** Sci Adv. 2016

BELOIN C, ROUX A, GHIGO JM. ***Escherichia coli* biofilms.** Curr Top Microbiol Immunol. 2008

Benzylpenicillin. <<www.drugbank.ca>> 23 de Janeiro de 2019. Acesso em 26 de Outubro de 2023

BLAIR, J., WEBBER, M., BAYLAY, A. ET AL. **Molecular mechanisms of antibiotic resistance.** Nat Rev Microbiol 13, 42–51 (2015)

BOYD, A., & CHAKRABARTY, A. M. ***Pseudomonas aeruginosa* biofilms: role of the alginate exopolysaccharide.** Journal of Industrial Microbiology, 1995

BRESLAWEC AP, WANG S, MONAHAN KN, BARRY LL, POULIN MB. **The endoglycosidase activity of Dispersin B is mediated through electrostatic interactions with cationic poly- β -(1 $\rightarrow$ 6)-N-acetylglucosamine.** FEBS J. 2023

BURMEISTER AR. **Horizontal Gene Transfer.** Evol Med Public Health. 2015 Jul 29;2015(1):193-4.

CDC. **Antibiotic Resistance Threats in the United States**, 2019. Atlanta, GA: U.S. Department of Health and Human Services, CDC; 2019

- CDC. **Enterotoxigenic E. coli (ETEC)** 2019 Disponível em <<<https://www.cdc.gov/ecoli/etec.html>>>. Acesso em 26 de Outubro de 2023
- CHAIGNON, P., SADOVSKAYA, I., RAGUNAH, C. *et al.* **Susceptibility of staphylococcal biofilms to enzymatic treatments depends on their chemical composition.** Appl Microbiol Biotechnol 2007
- CHANDKI R, BANTHIA P, BANTHIA R. **Biofilms: A microbial home.** J Indian Soc Periodontol. 2011.
- CHARACKLIS, W.G.;MARSHALL K.C **Biofilm processes. In Biofilms**, pp. 195–231. New York: Wiley 1990
- CHARRON, R. *et al.* **Biofilms as protective cocoons against biocides: from bacterial adaptation to One Health issues.** Microbiology Society. 2023
- CLAESSEN D, ROZEN DE, KUIPERS OP, SØGAARD-ANDERSEN L, VAN WEZEL GP. **Bacterial solutions to multicellularity: a tale of biofilms, filaments and fruiting bodies.** Nat Rev Microbiol. 2014
- COLLIGNON PJ, MCEWEN SA. **One Health-Its Importance in Helping to Better Control Antimicrobial Resistance.** Trop Med Infect Dis. 2019
- COLVIN KM, IRIE Y, TART CS, URBANO R, WHITNEY JC, RYDER C, HOWELL PL, WOZNAK DJ, PARSEK MR. **The Pel and Psl polysaccharides provide Pseudomonas aeruginosa structural redundancy within the biofilm matrix.** Environ Microbiol 2012
- CORNELIS P (2008). **Pseudomonas: Genomics and Molecular Biology** (1st ed.). Caister Academic Press. ISBN 978-1-904455-19-6.
- DABOOR S. M., ROHDE J. R., CHENG Z.. **Disruption of the extracellular polymeric network of Pseudomonas aeruginosa biofilms by alginate lyase enhances pathogen eradication by antibiotics.** J. Cyst. Fibros. 2021
- DAVEY, M. E., & O'TOOLE, G. A. (2000). **Microbial Biofilms: from Ecology to Molecular Genetics.** Microbiology and Molecular Biology Reviews,847–867
- DIGGLE SP, WHITELEY M. **Microbe Profile: Pseudomonas aeruginosa: opportunistic pathogen and lab rat.** Microbiology (Reading). 2020
- DINGES MM, ORWIN PM, SCHLIEVERT PM. **Exotoxins of Staphylococcus aureus.** Clin Microbiol Rev. 2000
- DOMOZYCH, D. S., KORT, S., BENTON, S. & YU, T. **The extracellular polymeric substance of the green alga Penium margaritaceum and its role in biofilm formation.** Biofilms 2. 2005
- DONLAN, R. M. . **Biofilms: Microbial Life on Surfaces.** Emerging Infectious Diseases,. 2002
- DUNNE WM., JR **Bacterial adhesion: seen any good biofilms lately?** Clin Microbiol Rev. 2002
- DUSENBERY, DAVID B **Living at Micro Scale.** Cambridge, 2009. Massachusetts: Harvard University Press. pp. 20–25. ISBN 978-0-674-03116-6.

ESPINAL P, MARTÍ S, VILA J. **Effect of biofilm formation on the survival of *Acinetobacter baumannii* on dry surfaces.** J Hosp Infect. 2012

FLEMING D, RUMBAUGH KP. **Approaches to Dispersing Medical Biofilms.** Microorganisms. 2017

FLEMMING, HC., WINGENDER, J. **The biofilm matrix.** Nat Rev Microbiol 8. 2010.

FLEMING D, CHAHIN L, RUMBAUGH K. **Glycoside Hydrolases Degrade Polymicrobial Bacterial Biofilms in Wounds.** Antimicrob Agents Chemother. 2016

GEDEFIE A, DEMSIS W, ASHAGRIE M, KASSA Y, TESFAYE M, TILAHUN M, BISETEGN H, SAHLE Z. ***Acinetobacter baumannii* Biofilm Formation and Its Role in Disease Pathogenesis: A Review.** Infect Drug Resist. 2021

HARE R. **New light on the history of penicillin.** Med Hist. 1982

HARIMAWAN, A. , TING, Y. **Investigation of extracellular polymeric substances (EPS) properties of *P. aeruginosa* and *B. subtilis* and their role in bacterial adhesion.** 2016

HØIBY NIELS, OANA CIOFU, AND THOMAS BJARNSHOLT. ***Pseudomonas aeruginosa* biofilms in cystic fibrosis.** Future Microbiology 2010

HUGENHOLTZ P. **"Exploring prokaryotic diversity in the genomic era".** Genome Biology. 3 (2): REVIEWS0003, 2002

IDREES M, SAWANT S, KARODIA N, RAHMAN A. ***Staphylococcus aureus* Biofilm: Morphology, Genetics, Pathogenesis and Treatment Strategies.** International Journal of Environmental Research and Public Health. 2021

ITO, A., TANIUCHI, A., MAY, T., KAWATA, K., & OKABE, S. **Increased Antibiotic Resistance of *Escherichia coli* in Mature Biofilms.** Applied and Environmental Microbiology, 2009

IZANO, E. A., AMARANTE, M. A., KHER, W. B., & KAPLAN, J. B. **Differential roles of poly-N-acetylglucosamine surface polysaccharide and extracellular DNA in *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* biofilms.** Applied and environmental microbiology. 2008

JACK N PENDLETON, SEAN P GORMAN & BRENDAN F GILMORE. **Clinical relevance of the ESKAPE pathogens, Expert Review of Anti-infective Therapy, 2013, 11:3, 297-308,**

JEONG SW, CHOI YJ. **Extremophilic Microorganisms for the Treatment of Toxic Pollutants in the Environment.** Molecules. 2020

JIANG, Y., GENG, M., & BAI, L. **Targeting Biofilms Therapy: Current Research Strategies and Development Hurdles.** Microorganisms, 2020

KADO CI. **Historical Events That Spawned the Field of Plasmid Biology.** Microbiol Spectr. 2014

KAPLAN J. B. **Biofilm dispersal: mechanisms, clinical implications, and potential therapeutic uses.** J. Dent. Res. 2010

KAPOOR G, SAIGAL S, ELONGAVAN A. **Action and resistance mechanisms of antibiotics: A guide for clinicians.** J Anaesthesiol Clin Pharmacol. 2017

KOVÁCS, Á.T., VAN GESTEL, J. AND KUIPERS, O.P. **The protective layer of biofilm: a repellent function for a new class of amphiphilic proteins.** Molecular Microbiology. 2012

LASA, I., PÉNADES, JR BAP: **A family of surface proteins involved in biofilm formation.** Research in Microbiology. 2006

LATASA, C., SOLANO, C., PENADÉS, J. R., & LASA, I. **Biofilm-associated proteins.** Comptes Rendus Biologies, 2006

LE MAUFF, F. ET AL **The Pel polysaccharide is predominantly composed of a dimeric repeat of α -1,4 linked galactosamine and N-acetylgalactosamine.** Nature. 2022

LI Y, NI M. **Regulation of biofilm formation in *Klebsiella pneumoniae*.** Front Microbiol. 2023

LIANOU A, NYCHAS GE, KOUTSOUMANIS KP. **Strain variability in biofilm formation: A food safety and quality perspective.** Food Res Int. 2020

LIM, E. S., KOO, O. K., KIM, M.-J., & KIM, J.-S. **Bio-enzymes for inhibition and elimination of *Escherichia coli* O157:H7 biofilm and their synergistic effect with sodium hypochlorite.** Scientific Reports, (2019)

LIMOLI DH, JONES CJ, WOZNIAK DJ. **Bacterial Extracellular Polysaccharides in Biofilm Formation and Function.** Microbiol Spectr. 2015

LIN MF, LAN CY. **Antimicrobial resistance in *Acinetobacter baumannii*: From bench to bedside.** World J Clin Cases. 2014

LITTLE DJ, PFOH R, LE MAUFF F, ET AL. **PgaB orthologues contain a glycoside hydrolase domain that cleaves deacetylated poly- β (1,6)-N-acetylglucosamine and can disrupt bacterial biofilms.** PLoS Pathog. 2018

MCNAMARA JT, MORGAN JL, ZIMMER J. **A molecular description of cellulose biosynthesis.** Annu Rev Biochem. 2015

MAHMOOD HY, JAMSHIDI S, SUTTON JM, RAHMAN KM. **Current Advances in Developing Inhibitors of Bacterial Multidrug Efflux Pumps.** Curr Med Chem. 2016

MASCINI, E. M., A. TROELSTRA, M. BEITSMA, H. E. M. BLOK, K. P. JALINK, T. E. M. HOPMANS, A. C. FLUIT, R. J. HENÉ, R. J. L. WILLEMS, J. VERHOEF, M. J. M. BONTEN, **Genotyping and Preemptive Isolation to Control an Outbreak of Vancomycin-Resistant *Enterococcus faecium*,** Clinical Infectious Diseases, Volume 42, Issue 6, 15 March 2006, Pages 739–746

MASALHA M, BOROVOK I, SCHREIBER R, AHARONOWITZ Y, COHEN G. **Analysis of transcription of the *Staphylococcus aureus* aerobic class Ib and anaerobic class III ribonucleotide reductase genes in response to oxygen..** 2001

MANYI-LOH C, MAMPHWELI S, MEYER E, OKOH A. **Antibiotic Use in Agriculture and Its Consequential Resistance in Environmental Sources: Potential Public Health Implications.** Molecules. 2018

MARTINSON JNV, WALK ST. ***Escherichia coli* Residency in the Gut of Healthy**

Human Adults. EcoSal Plus. 2020

MIRZAEI, R., MOHAMMADZADEH, R., ALIKHANI, M. Y., SHOKRI MOGHADAM, M., KARAMPOOR, S., KAZEMI, S., YOUSEFIMASHOUF, R. **The biofilm-associated bacterial infections unrelated to indwelling devices.** IUBMB Life. 2020

MOBOLAJI ADEOLU¹, SEEMA ALNAJAR¹, SOHAIL NAUSHAD, RADHEY S. GUPTA. **Genome-based phylogeny and taxonomy of the ‘Enterobacteriales’: proposal for Enterobacterales ord. nov. divided into the families Enterobacteriaceae, Erwiniaceae fam. nov., Pectobacteriaceae fam. nov., Yersiniaceae fam. nov., Hafniaceae fam. nov., Morganellaceae fam. nov., and Budviciaceae fam. nov.** 2016

MOELLERING RC JR. **Antibiotic resistance: lessons for the future.** Clin Infect Dis. 1998

MONROE S, POLK R. **Antimicrobial use and bacterial resistance.** Curr Opin Microbiol. 2000

MONTANARO L, POGGI A, VISAI L, RAVAIOLI S, CAMPOCCIA D, SPEZIALE P, ARCIOLA CR. **Extracellular DNA in biofilms.** Int J Artif Organs. 2011

MULANI MS, KAMBLE EE, KUMKAR SN, TAWRE MS, PARDESI KR. **Emerging Strategies to Combat ESKAPE Pathogens in the Era of Antimicrobial Resistance: A Review.** Front Microbiol. 2019

NATHAN K. ARCHER, MARK J. MAZAITIS, J. WILLIAM COSTERTON, JEFF G. LEID, MARY ELIZABETH POWERS & MARK E. SHIRTLIFF. **Staphylococcus aureus biofilms**, 2011 Virulence, 2:5, 445-459

NEWCOMBE, H. **Origin of Bacterial Variants.** Nature 164, 150–151 (1949).

NEMOTO, K.; HIROTA, K.; MURAKAMI, K.; TANIGUTI, K.; MURATA, H.; VIDUCIC, D.; MIYAKE, Y. **Effect of varidase (streptodornase) on biofilm formed by Pseudomonas aeruginosa.** Chemotherapy 2003, 49, 121–125

PAGANELLI FL, WILLEMS RJ, JANSEN P, HENDRICKX A, ZHANG X, BONTEN MJ, LEAVIS HL. **Enterococcus faecium biofilm formation: identification of major autolysin AtlAEfm, associated Acm surface localization, and AtlAEfm-independent extracellular DNA Release.** mBio. 2013

Postgate J (1998). **Nitrogen Fixation** (3rd ed.). Cambridge University Press. ISBN 978-0-521-64047-3

RAMAKRISHNAN R, SINGH AK, SINGH S, CHAKRAVORTTY D, DAS D. **Enzymatic dispersion of biofilms: An emerging biocatalytic avenue to combat biofilm-mediated microbial infections.** J Biol Chem. 2022

RAMASUBBU N, THOMAS LM, RAGUNATH C, KAPLAN JB. **Structural analysis of dispersin B, a biofilm-releasing glycoside hydrolase from the periodontopathogen Actinobacillus actinomycetemcomitans.** J Mol Biol. 2005

RICHARD G. WAX, KIM LEWIS, ABIGAIL A. SALYERS, HARRY TABER. CRC. **Bacterial resistance to antimicrobials.** Boca Raton (Fla.): Crc Press/Taylor & Francis, Cop, 2008.

ROLLET, C., GAL, L., & GUZZO, J. **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, 2008

RYAN KJ, RAY CG, SHERRIS JC. **Sherris Medical Microbiology** (4th ed.) 2004. McGraw Hill. pp. 294–5. ISBN 0-8385-8529-9.

SANTAJIT S, INDRAWATTANA N. **Mechanisms of Antimicrobial Resistance in ESKAPE Pathogens**. Biomed Res Int. 2016

SAUER, K., CAMPER, A. K., EHRLICH, G. D., COSTERTON, J. W., & DAVIES, D. G. ***Pseudomonas aeruginosa* Displays Multiple Phenotypes during Development as a Biofilm**. Journal of Bacteriology, 2002

SAUER K, STOODLEY P, GOERES DM, HALL-STOODLEY L, BURMØLLE M, STEWART PS, BJARNSHOLT T. **The biofilm life cycle: expanding the conceptual model of biofilm formation**. Nat Rev Microbiol. 2022

SCHENCK, L.P., SURETTE, M.G. AND BOWDISH, D.M.E. **Composition and immunological significance of the upper respiratory tract microbiota**. 2016 FEBS Lett, 590: 3705-3720.

SERRA, D. O., RICHTER, A. M., & HENGGE, R.. **Cellulose as an Architectural Element in Spatially Structured *Escherichia coli* Biofilms**. Journal of Bacteriology. 2013

SHARMA, K., & PAGEDAR SINGH, A. (2018). **Antibiofilm Effect of DNase against Single and Mixed Species Biofilm**. Foods, 7(3), 42

SOUICY, S., HUANG, J. & GOGARTEN, J. **Horizontal gene transfer: building the web of life**. Nat Rev Genet 16, 472–482 (2015).

SLONCZEWSKI JL, FOSTER JW. **Microbiology: an Evolving Science** (3^a ed.). New York: W W Norton. p. 82, 2013

STAPPER AP, NARASIMHAN G, OHMAN DE, BARAKAT J, HENTZER M, MOLIN S, KHARAZMI A, HØIBY N, MATHEE K. **Alginate production affects *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development and architecture, but is not essential for biofilm formation**. J Med Microbiol 2004

STOODLEY P, SAUER K, DAVIES DG, COSTERTON JW. **Biofilms as complex differentiated communities**. Annu Rev Microbiol. 2002

SUMMERS AO. **Genetic linkage and horizontal gene transfer, the roots of the antibiotic multi-resistance problem**. Anim Biotechnol. 2006

TANG ET AL. **Role of extracellular polymeric substances on nutrients storage and transfer in algal-bacteria symbiosis sludge system treating wastewater**. Bioresource Technology 2021

TAYLOR TA, UNAKAL CG. **Staphylococcus aureus Infection**. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2023

TETZ, V. V., & TETZ, G. V. **Effect of Extracellular DNA Destruction by DNase I on Characteristics of Forming Biofilms**. DNA and Cell Biology, 29(8), 399–405, 2010

THANBICHLER M, WANG SC, SHAPIRO L. **The bacterial nucleoid: a highly organized and dynamic structure**. J Cell Biochem. 2005

- THI MTT, WIBOWO D, REHM BHA. ***Pseudomonas aeruginosa* Biofilms**. Int J Mol Sci. 2020
- TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. Microbiology : an introduction. 12. ed. Boston: Pearson, 2016.
- TUON FF, DANTAS LR, SUSS PH, TASCA RIBEIRO V.S. **Pathogenesis of the *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm: A Review**. Pathogens. 2022
- UK Standards for Microbiology Investigations: Identification of *Pseudomonas* species and other Non- Glucose Fermenters"** . Public Health England. 13 April 2015.
- VARELA MF, STEPHEN J, LEKSHMI M, OJHA M, WENZEL N, SANFORD LM, HERNANDEZ AJ, PARVATHI A, KUMAR SH. **Bacterial Resistance to Antimicrobial Agents**. Antibiotics (Basel). 2021
- VERDEROSA A. D. MAKRINA TOTSIKA KATHRYN E. FAIRFULL-SMITH **Bacterial Biofilm Eradication Agents: A Current Review**. Front. Chem. 2019
- VERHOEF R, BELDMAN G, SCHOLS HA, SIIKA-AHO M, RÄTTÖ M, BUCHERT J, VORAGEN AG. **Characterisation of a 1,4-beta-fucoside hydrolase degrading colanic acid**. Carbohydr Res. 2005
- VU B, CHEN M, CRAWFORD RJ, IVANOVA EP. **Bacterial extracellular polysaccharides involved in biofilm formation**. Molecules. 2009
- WILLEMS R, TOP J, VAN SANTEN M, ROBINSON D, COQUE TM, BAQUERO F, ET AL. **Global Spread of Vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* from Distinct Nosocomial Genetic Complex**. Emerg Infect Dis. 2005
- WOOD TK, GONZALEZ BARRIOS AF, HERZBERG M, LEE J. **Motility influences biofilm architecture in *Escherichia coli***. Appl Microbiol Biotechnol. 2006
- WOZNIAK, D. J., WYCKOFF, T. J. O., STARKEY, M., KEYSER, R., AZADI, P., O'TOOLE, G. A., & PARSEK, M. R. **Alginate is not a significant component of the extracellular polysaccharide matrix of PA14 and PAO1 *Pseudomonas aeruginosa* biofilms**. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2003
- YAKANDAWALA N, GAWANDE PV, LOVETRI K, *et al*. **Characterization of the poly- β -1,6-N-acetylglucosamine polysaccharide component of *Burkholderia* biofilms**. Appl Environ Microbiol. 2011
- YANG DC, BLAIR KM, SALAMA NR. **Staying in Shape: the Impact of Cell Shape on Bacterial Survival in Diverse Environments**. Microbiol Mol Biol Rev. 2016
- YANG L, HU Y, LIU Y, ZHANG J, ULSTRUP J, MOLIN S. **Distinct roles of extracellular polymeric substances in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development**. Environ Microbiol 2011
- YOCUM RR, RASMUSSEN JR, STROMINGER JL. **The mechanism of action of penicillin. Penicillin acylates the active site of *Bacillus stearothermophilus* D-alanine carboxypeptidase**. J Biol Chem. 1980
- YU, S., SU, T., WU, H., LIU, S., WANG, D., ZHAO, T., et al. **PsIG, a self-produced glycosyl hydrolase, triggers biofilm disassembly by disrupting exopolysaccharide matrix**. Cell Res. 2015

ZENG, W., LI, F., WU, C. *et al.* **Role of extracellular polymeric substance (EPS) in toxicity response of soil bacteria *Bacillus* sp. S3 to multiple heavy metals.** Bioprocess Biosyst Eng 43, 2020

ZHAO A, SUN J, LIU Y. **Understanding bacterial biofilms: From definition to treatment strategies.** Front Cell Infect Microbiol. 2023