

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos
Área de Bromatologia

**Inibição do *quorum sensing* em *Pseudomonas aeruginosa*:
explorando o potencial antivirulência dos compostos fenólicos**

Emília Maria França Lima

Tese para obtenção do título de Doutora.
Orientador: Prof. Dr. Uelinton Manoel Pinto.

São Paulo
2023

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos
Área de Bromatologia

**Inibição do *quorum sensing* em *Pseudomonas aeruginosa*:
explorando o potencial antivirulência dos compostos fenólicos**

Emília Maria França Lima

Versão simplificada

Tese para obtenção do título de Doutora.
Orientador: Prof. Dr. Uelinton Manoel Pinto.

São Paulo
2023

RESUMO

Lima, E.M.F. **Inibição do *quorum sensing* em *Pseudomonas aeruginosa*: explorando o potencial antivirulência dos compostos fenólicos.** 2023. 144f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2023.

As bactérias coordenam a expressão gênica de forma dependente da densidade celular em um processo de comunicação denominado *quorum sensing* (QS). A expressão de fatores de virulência, formação de biofilmes e produção de enzimas são exemplos de fenótipos regulados pelo QS que podem interferir na qualidade e segurança dos alimentos. Devido à importância desses fenótipos, existe interesse na inibição da comunicação bacteriana, compreendendo uma estratégia antivirulência. Este trabalho teve o objetivo de avaliar o efeito de compostos fenólicos na inibição de fenótipos regulados por QS em *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, utilizando concentrações que não interferem na multiplicação do micro-organismo. Inicialmente, é apresentada uma revisão bibliográfica sobre os sistemas de comunicação por QS, os mecanismos de inibição, e as classificações dos compostos fenólicos. As análises experimentais iniciaram-se com o estudo *in silico* por ancoragem molecular de 82 compostos fenólicos com as proteínas LasR e RhIR de *P. aeruginosa*, a fim de selecionar potenciais compostos inibidores do QS. Em seguida, foi realizada uma triagem com treze compostos fenólicos, utilizando as estirpes biossensoras *P. aeruginosa lasB-gfp* e *P. aeruginosa rhIA-gfp*, que emitem fluorescência quando o sistema de QS está ativado. Oito compostos foram selecionados e avaliados quanto à inibição dos principais fatores de virulência regulados pelo QS em *P. aeruginosa*: piocianina, ramnolipídios, proteases, elastases e motilidade. Quatro compostos com melhores atividades foram selecionados para as próximas análises, sendo avaliado o efeito de ácido rosmarínico, baicaleína, curcumina e resveratrol na hidrólise das proteínas do leite UHT, causada por *P. aeruginosa*. Por fim, foi avaliado o sinergismo entre os fenólicos com tobramicina e entre os próprios fenólicos. As combinações testadas revelaram-se como uma estratégia para reduzir a dose do antibiótico nos tratamentos e obter resultados satisfatórios contra a formação de biofilmes de *P. aeruginosa*. A combinação dos quatro compostos inibiu completamente a formação dos biofilmes. Os resultados obtidos colaboram para o entendimento do efeito dos compostos fenólicos na inibição do QS, podendo contribuir com a definição de mecanismos de inibição, além de ampliar o potencial biotecnológico desses compostos para futuras aplicações nas indústrias alimentícia e farmacêutica.

Palavras-chave: Ancoragem molecular. Biofilmes. Comunicação bacteriana. Inibição da virulência. Microscopia. Sinergismo.

ABSTRACT

Lima, E.M.F. **Quorum sensing inhibition in *Pseudomonas aeruginosa*: exploring the antivirulence potential of phenolic compounds**. 2023. 144f. Thesis (Doctorate) – Faculty of Pharmaceutical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, 2023.

Bacteria coordinate gene expression in a cell density-dependent manner in a communication process called quorum sensing (QS). The expression of virulence factors, biofilm formation and enzyme production are examples of QS-regulated phenotypes that can interfere with food quality and safety. Due to the importance of these phenotypes, there is great interest in inhibiting bacterial communication, comprising an anti-virulence strategy. This work aimed to evaluate the effect of phenolic compounds on the inhibition of QS-regulated phenotypes in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, using concentrations that do not interfere in bacterial growth. Initially, we presented a literature review on QS systems, QS inhibition, and classifications of phenolic compounds. The experimental analyzes began with the *in silico* study by molecular docking of 82 phenolic compounds with the LasR and RhlR proteins of *P. aeruginosa*, in order to select potential QS inhibitor compounds. Then, a screen with 13 phenolic compounds was performed, using biosensor strains *P. aeruginosa lasB-gfp* and *P. aeruginosa rhlA-gfp*, which emit fluorescence when the QS system is activated. Eight compounds were selected and evaluated for inhibition of the main QS-regulated virulence factors in *P. aeruginosa*: pyocyanin, rhamnolipids, proteases, elastase and motility. From these, four compounds were selected for the next analyses, in which the effect of rosmarinic acid, baicalein, curcumin and resveratrol was evaluated on the hydrolysis of UHT milk proteins caused by *P. aeruginosa*. Finally, the synergistic effect of phenolics with tobramycin and between the phenolics themselves was evaluated. The tested combinations proved to be a strategy to reduce the antibiotic dose in treatments and to obtain satisfactory results against the *P. aeruginosa* biofilms. The combination of the four compounds completely inhibited the biofilm formation. The obtained results contribute to the understanding of the effect of phenolic compounds on QS inhibition, which may contribute to the definition of inhibition mechanisms, in addition to expanding the biotechnological potential of these compounds for future applications in the food and pharmaceutical industries.

Keywords: Molecular docking. Biofilms. Bacterial communication. Inhibition of virulence. Microscopy. Synergism.