



UNIVERSIDADE D  
COIMBRA

Ana Carolina Esteves Cardoso

Relatório de Estágio e Monografia intitulada “Inibição do Sistema QS dependente de AI-2 como Terapia Antivirulência” referentes à Unidade Curricular “Estágio”, sob orientação da Dra. Joana Margarida Mendes Santos e do Professor Doutor Alcino Jorge Lopes Leitão apresentados à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, para apreciação na prestação de provas públicas de Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas

Setembro de 2020



UNIVERSIDADE D  
COIMBRA

Ana Carolina Esteves Cardoso

Relatório de Estágio e Monografia intitulada “Inibição do Sistema QS dependente de AI-2 como Terapia Antivirulência” referentes à Unidade Curricular “Estágio”, sob orientação da Dra. Joana Margarida Mendes Santos e do Professor Doutor Alcino Jorge Lopes Leitão apresentados à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, para apreciação na prestação de provas públicas de Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas.

Setembro 2020

## **Declaração de Autoria**

Eu, Ana Carolina Esteves Cardoso, estudante do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, com o nº 2015236222, declaro assumir toda a responsabilidade pelo conteúdo do Documento Relatório de Estágio e Monografia intitulada “Inibição do Sistema QS dependente de AI-2 como Terapia Antivirulência” apresentados à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, no âmbito da unidade de Estágio Curricular.

Mais declaro que este Documento é um trabalho original e que toda e qualquer afirmação ou expressão, por mim utilizada, está referenciada na Bibliografia, segundo os critérios bibliográficos legalmente estabelecidos, salvaguardando sempre os Direitos de Autor, à exceção das minhas opiniões pessoais.

Coimbra, 8 de setembro de 2020

Ana Carolina Esteves Cardoso

(Ana Carolina Esteves Cardoso)

## **Agradecimentos**

A elaboração e apresentação da presente monografia e relatório de estágio simbolizam o última etapa do meu percurso académico e quero agradecer a todos os que me apoiaram nesta jornada:

*Aos meus pais, irmão, madrinha e Raquel,*

Por me terem permitido dar os meus próprios passos, acompanhando-me sempre de perto, com muito amor e carinho. Por nunca me deixarem desistir ao mostrar que o dia de amanhã é mais brilhante que o de hoje.

*Às minhas “ladies”, Irina, Rita, Gisela e Sofia,*

Por todo o carinho e amizade que me proporcionaram ao longo destes cinco anos. Por todas as sessões infundáveis de estudo, pelas saídas à noite, pelas as noitadas de jogos e conversa e por todos os sorrisos e lágrimas, maioritariamente minhas, que partilhamos.

*Às minhas meninas da RAJA,*

Por terem sido a minha família em Coimbra e me terem feito sentir em casa todos os dias. Continuem a acolher cada novo elemento como eu fui acolhida e como vos ensinei a acolher, mostrem-lhes o quão especial é estar incluída num grupo como o nosso, de apoio, carinho e muito amor.

*Ao Professor Doutor Alcino Leitão,*

Pelo apoio demonstrado, pela disponibilidade e orientação e por ter partilhado os seus conhecimentos comigo.

*À Equipa da Farmácia Saúde,*

Em particular à Dra. Anabela Mascarenhas e à Dra. Joana Santos, pelo apoio constante durante estes sete meses, pela disponibilidade e partilha de conhecimentos e por cada sorriso no momento certo.

*E a ti, Coimbra,*

A cidade que me aceitou de braços abertos e foi a minha casa durante cinco fantástico anos. Sem ti não seria a pessoa que sou hoje, obrigada por me teres permitido ter uma das melhores experiências da minha vida, acompanhada de pessoas inspiradoras.

Obrigada!

“Don’t limit yourself. Many people limit themselves to what they think they can do. You can go as far as your mind lets you. What you believe, remember, you can achieve.”

– Mary Kay Ash

## Índice

### Parte I – Relatório de Estágio em Farmácia Comunitária

Lista de Abreviaturas .....	8
1. Introdução .....	9
2. Contextualização da Farmácia Saúde .....	9
3. Análise SWOT .....	10
3.1. Pontos Fortes.....	10
3.1.1. Aprendizagem Gradual .....	10
3.1.2. Período de Estágio .....	12
3.1.3. Localização e Tipologia de Utentes .....	12
3.1.4. Equipa Diversificada e Dinâmica .....	13
3.1.5. Serviços Farmacêuticos.....	13
3.1.6. Medicamentos Manipulados.....	14
3.1.7. Desafios Impostos pela Equipa.....	15
3.2. Pontos Fracos .....	15
3.2.1. Falta de Prática e Insegurança Inicial.....	15
3.2.2. Não Realização da Consulta de Acompanhamento Farmacoterapêutico.....	16
3.3. Oportunidades.....	16
3.3.1. Participação em Formações.....	16
3.3.2. Unidade Curricular de Gestão de Informação em Saúde.....	17
3.4. Ameaças.....	17
3.4.1. Pandemia de SARS-CoV-2.....	17
3.4.2. Plano Curricular do MICF.....	18
3.4.3. Iliteracia em Saúde .....	18
4. Casos Clínicos .....	19
4.1. Congestão Nasal .....	19
4.2. Não cedência de Eutirox® .....	19
4.3. Necessidade de Medicamento Manipulado .....	20
4.4. Insuficiência Venosa .....	20
4.5. Infecção Urinária .....	21
5. Considerações Finais.....	22
Referências Bibliográficas.....	23
Anexo.....	24

## Parte II – Inibição do Sistema de QS dependente de AI-2 como Terapia

### Antivirulência

Resumo .....	28
Abstract .....	29
Lista de Abreviaturas .....	30
1. Introdução .....	31
2. Sistema de Comunicação <i>Quorum Sensing</i> .....	32
2.1. Moléculas Sinalizadoras – Auto-indutores .....	33
3. AI Universal: Auto-indutor-2 .....	35
3.1. Síntese do AI-2 .....	36
3.2. Interação AI-2 – Célula.....	38
3.2.1. Transdução do Sinal com o Recetor LsrB.....	39
3.2.2. Transdução do Sinal com o Recetor LuxP.....	40
3.3. Impacto do AI-2 nos Fenótipos Bacterianos .....	42
4. Inibidores do Sistema QS-AI-2 .....	44
4.1. Inibição da MTA/SAH nucleosidase .....	45
4.2. Inibição da LuxS.....	47
4.2.1. Inibidores Análogos do SRH.....	49
4.2.2. Inibidores Não Análogos do Substrato.....	50
4.3. Inibição do AI-2 .....	51
4.4. Inibidores dos Recetores e da Transdução.....	52
4.4.1. Inibidores Análogos do DPD.....	52
4.4.2. Inibidores do Recetor LuxP.....	54
4.5. Compostos Naturais.....	55
4.5.1. Furanonas Halogenadas .....	55
4.5.2. Ácidos Gordos.....	56
4.5.3. Aldeído cinâmico e derivados .....	56
4.5.4. Sumo de Toranja .....	56
5. Perspetivas Futuras.....	57
6. Conclusão .....	58
Referências Bibliográficas.....	60
Anexos.....	67

# Parte I

## Relatório de Estágio em Farmácia Comunitária

Farmácia Saúde





## **Lista de Abreviaturas**

**ARSC** – Administração Regional de Saúde Centro

**MICF** – Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas

**MNSRM** – Medicamentos Não Sujeitos a Receita Médica

**MSRM** – Medicamentos Sujeitos a Receita Médica

**PIM** – Preparação Individualizada da Medicação

**SFEVTI** – Serviço Farmacêutico de Ensino e Verificação da Técnica Inalatória

**SWOT** – *Strengths, Weaknesses, Opportunities and Treats*

## **I. Introdução**

O Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas (MICF) culmina com a realização do Estágio Curricular, que surge como uma unidade curricular que visa a aplicação prática dos conhecimentos científicos lecionados ao longo dos quatro anos e meio de curso, de forma a completar a formação académica dos futuros Farmacêuticos.

A Farmácia Comunitária representa o setor farmacêutico com maior contacto com a população, sendo muitas vezes o primeiro e/ou último contacto do utente com o Sistema de Saúde. Como especialista do medicamento, o Farmacêutico centra a sua atividade na utilização segura, eficaz e racional do medicamento, mantendo sempre em mente a exigente tarefa de acompanhar a atualização constante de conhecimento científico. Adicionalmente, com foco permanente no utente, as farmácias oferecem cada vez mais serviços farmacêuticos diferenciados e essenciais à manutenção da saúde, tanto a nível preventivo como terapêutico.

Neste seguimento, o meu Estágio Curricular foi realizado na Farmácia Saúde, na Figueira da Foz, sob orientação da Dra. Joana Santos, e o período foi compreendido ente 6 de janeiro e 16 de agosto de 2020. O presente relatório consiste numa breve descrição introdutória da Farmácia Saúde e numa análise SWOT, onde constam, a nível interno, os pontos fortes (*Strengths*) e fracos (*Weaknesses*) do meu estágio em farmácia comunitária e, a nível externo, as oportunidades (*Opportunities*) e as ameaças (*Treats*) do contexto em análise.

## **2. Contextualização da Farmácia Saúde**

A Farmácia Saúde abriu ao público em 1960, em Buarcos. No entanto, foi transferida para o *Shopping Atlântico*, na Rotunda do Limonete em Tavarede, Figueira da Foz, onde se encontra atualmente.

Aberta todos os dias da semana, no início do ano, o horário laboral nos dias úteis e sábados era das 9h às 21h e aos domingos e feriados era das 9h às 13h. No entanto, devido à situação pandémica, o horário sofreu sucessivas alterações, passando a estar aberta das 9h às 20h. Além disso, de 13 em 13 dias, a Farmácia Saúde cumpre serviço de regime permanente, escala de serviço estabelecia em regime obrigatório pela Administração Regional de Saúde Centro, I.P. (ARSC).

A equipa da Farmácia Saúde é constituída por um diversificado grupo de profissionais qualificados e dinâmicos, sendo a direção técnica assumida pela Dra. Anabela Mascarenhas (proprietária, juntamente com o Engenheiro Flávio Maia). A restante equipa é constituída por, sete farmacêuticos, dois deles farmacêuticos substitutos, quatro técnicos licenciados em

farmácia, um técnico de farmácia, duas técnicas auxiliares de farmácia e, ainda, duas técnicas indiferenciadas.

De acordo com o 29º artigo do Regime Jurídico das Farmácias de Oficina<sup>[1]</sup>, a Farmácia Saúde encontra-se organizada em espaços bem delimitados que permitem a “segurança, conservação e preparação de medicamentos”, assim como, a “acessibilidade, comodidade e privacidade dos utentes e do respetivo pessoal”. Dispõem de uma sala de atendimento ao público, com sete balcões, e dois gabinetes de atendimento personalizado, que garantem a privacidade e confidencialidade do utente. O *backoffice* é constituído por uma zona de gestão e receção de encomendas, uma de armazenamento dos medicamentos e outra dedicada à equipa, com cacifos e instalações sanitárias particulares. No andar superior existem, ainda, outros dois gabinetes onde decorrem, por exemplo, as consultas de nutrição. Neste piso está localizada, também, uma sala de reuniões para atividades de formação, palestras e outras atividades dinamizadas pela Farmácia, o laboratório de preparação de medicamentos manipulados, o gabinete da direção e instalações sanitárias.

### 3. Análise SWOT

<p>Aprendizagem Gradual Localização e Tipologia dos Utentes Equipa Dinâmica e Diversificada Período de Estágio Serviços Farmacêuticos Medicamentos Manipulados Desafios Impostos pela Equipa</p>	<p>Não Realização da Consulta de Acompanhamento Farmacoterapêutico Falta de Prática e Insegurança Inicial</p>
<b>Pontos Fortes</b>	<b>Pontos Fracos</b>
<b>Oportunidades</b>	<b>Ameaças</b>
<p>Participação em Formações Unidade Curricular de Gestão de Informação em Saúde</p>	<p>Pandemia de SARS-CoV-2 Plano Curricular de MICF Iliteracia em Saúde</p>

**Gráfico I** – Resumo dos pontos explanados na análise SWOT.

#### 3.1. Pontos Fortes

##### 3.1.1. Aprendizagem Gradual

A Farmácia Saúde recebe os seus estagiários com um plano de estágio adaptado às necessidades do estagiário e do setor o que demonstrou ser uma mais valia no meu processo de aprendizagem. O objetivo é incentivar a familiarização gradual com o espaço, com o sistema informático (Sifarma 2000<sup>®</sup>) e com as atividades desempenhadas. Iniciei o

meu estágio a desempenhar funções no *backoffice*, sendo o foco principal de aprendizagem, desta fase, a receção e gestão de encomendas, para que possamos começar a familiarizar com os diferentes medicamentos sujeitos e não sujeitos a receita médica, suplementos alimentares e produtos de bem saúde e bem estar disponíveis, mas também com as diversas formas farmacêuticas existentes no mercado. Adquiri, também, conhecimentos de gestão de *stocks* e de organização interna da farmácia.

Dado que realizei o meu estágio de verão, no ano letivo anterior, também na Farmácia Saúde, algumas das tarefas inerentes à gestão de encomendas já me eram familiares, o que permitiu encurtar o tempo que permaneci no *backoffice*. Do mesmo modo, a minha integração na equipa e a familiarização com o espaço da farmácia foram também facilitadas.

Já nesta primeira fase, iniciei o contacto com o público ao atender chamadas telefónicas. Posteriormente, quando passei para a fase do atendimento, comecei por acompanhar alguns colegas. Nesta etapa, pude observar a forma como cada profissional abordava o utente e direcionava o atendimento, assim como as questões que colocavam durante o aconselhamento e como se processava a cedência de medicamentos sujeitos a receita médica (MSRM) e medicamentos não sujeitos a receita médica (MNSRM). Em atendimentos com receita médica, tive, também, a oportunidade de aprender como aceder à ficha do utente e verificar o seu histórico. Este passo de extrema importância, principalmente em doentes polimedicados, uma vez que é nossa responsabilidade, enquanto profissionais de saúde, validar a medicação prescrita e avaliar se coincide com o registo prévio que temos do doente para que, caso tal não aconteça, possamos perceber o motivo da alteração. Considero que esta aprendizagem gradual permitiu-me adquirir e consolidar conhecimentos de forma gradual, o que agilizou o processo de aprendizagem e contribuiu, posteriormente, para uma qualidade de atendimento mais elevada, assim como, a diminuição do tempo de espera do utente, otimizando a celeridade do atendimento. A equipa da Farmácia Saúde mostrou-se sempre disponível para me esclarecer qualquer dúvida e discutir comigo de casos clínicos que foram surgindo.

Passado este período, a equipa, de forma gradual, foi-me dando alguma autonomia nos atendimentos até que, quando me senti mais confortável, comecei a exercer todas as tarefas de forma autónoma, com supervisão permanente dos farmacêuticos responsáveis, mas sendo sempre incentivada a ter uma visão crítica, a colocar questões à equipa e a estudar protocolos de aconselhamento, principalmente de temáticas com as quais tinha tido menos contacto durante a minha formação académica.

### **3.1.2. Período de Estágio**

Existe uma sazonalidade característica das necessidades dos utentes. A título de exemplo, nos primeiros meses do ano, as questões que nos apresentam estão mais relacionadas com afeções do trato respiratório, como casos de gripe e constipações. No entanto, com a entrada da primavera, estes casos são gradualmente substituídos por situações alérgicas e uma maior preocupação com cuidados de dermocosmética e veterinários. Assim sendo e uma vez que o meu estágio decorreu entre janeiro e agosto, tive a oportunidade de entrar em contacto com uma maior gama de produtos considerados sazonais.

Outra condicionante particular foi a situação pandémica da COVID-19, uma situação sem precedentes que teve um impacto enorme nas nossas vidas e no nosso país. Instalou-se um ambiente de incerteza e medo, também, perceptível na farmácia, não apenas da nossa parte, mas também dos utentes. Nas semanas entre o início do aumento de casos na Europa e a declaração de estado de emergência em Portugal, a procura dos nossos serviços aumentou muito, principalmente, para a dispensa do receituário habitual. E, mais do que nunca, tornou-se imperativo atualizarmos os nossos conhecimentos diariamente e, durante o atendimento, sensibilizar os utentes para o facto de nos apresentarmos perante uma situação nova e potencialmente perigosa, que requeria atualização constante em fontes fidedignas. A certo nível, criou-se uma ligação mais pessoal e de maior confiança com os utentes. Neste período, senti um enorme crescimento a nível académico e pessoal, motivo pelo qual considero que muitas das competências de comunicação que adquiri durante o estágio ocorreram durante estas semanas.

### **3.1.3. Localização e Tipologia de Utes**

Visto que a farmácia se localiza numa zona residencial, mas, também, num centro comercial e numa cidade com bastante turismo, tive a oportunidade de contactar com um grande leque de personalidades. Entre eles, utentes fidelizados, que procuram de forma mais recorrente os serviços prestados pela farmácia, para a dispensa do seu receituário habitual, mas também para a medição de parâmetros bioquímicos. Deste modo, torna-se possível fazer um acompanhamento continuado e individualizado do utente e, ao mesmo tempo, desenvolver uma relação de empatia e confiança. Tal facilita a avaliação da adesão à terapêutica, a identificação de possíveis erros relacionados com a medicação e o aconselhamento de produtos farmacêuticos complementares. Os utentes de passagem ou não fidelizados, por norma, apresentam situações mais pontuais, como por exemplo, afeções benignas e situações autolimitadas que envolvem, habitualmente, o aconselhamento de

produtos de dermocosmética ou MNSRM. Em geral, a abordagem a estes utentes é ligeiramente diferente, uma vez que, durante o atendimento, é necessário identificar o problema apresentado, perceber o contexto e patologias associadas, enquanto se tenta, ao mesmo tempo, ganhar a sua confiança em poucos minutos.

Assim sendo, o elevado fluxo de utentes e a heterogeneidade da população demonstrou ser um desafio, uma vez que requer personalização do atendimento e constante adaptação do discurso. Os produtos requisitados foram, também, eles muito diversificados. Para além da medicação convencional, havia procura de produtos fitoterápicos e alguns produtos homeopáticos. Tal permitiu-me desenvolver competências de comunicação e aprofundar conhecimentos teóricos adquiridos ao longo do curso.

#### **3.1.4. Equipa Diversificada e Dinâmica**

De forma a otimizar o funcionamento da farmácia, diferentes áreas de atuação como conferência de receituário, organização de documentação e definição de procedimentos, preparação de Medicamentos Manipulados, Preparação Individualizada de Medicação (PIM), Acompanhamento Farmacêutico e dinamização e gestão de produtos de dermocosmética, veterinária e ortopedia, entre outras, estão atribuídas a determinados elementos da equipa que apresentam formação específica para a realização dessas funções. Este método de gestão de recursos humanos, permite que cada elemento da equipa aprofunde os seus conhecimentos numa determinada área, de forma especializada, o que facilita a atualização constante e, conseqüentemente, a formação de toda a equipa nesse âmbito, quando necessário. Por conseguinte, as explicações fornecidas sobre estes temas tornaram-me mais apta para responder às mais variadas exigências inerentes ao funcionamento de uma farmácia. Assim, muitas das minhas limitações foram ultrapassadas devido à disponibilidade de toda a equipa permitindo-me aconselhar o utente, segura da informação que transmito.

#### **3.1.5. Serviços Farmacêuticos**

Para responder às necessidades de saúde dos utentes, a Farmácia Saúde disponibiliza diversos serviços farmacêuticos e de promoção à saúde<sup>[2]</sup>. Nestes incluem-se a medição da glicemia (para controlo da *Diabetes mellitus*), da pressão arterial, do colesterol total isolado, mas, também, do perfil lipídico completo (que inclui valores de Triglicéridos, HDL e LDL), para o controlo da terapêutica e de fatores de risco associados às Doenças Cardiovasculares. Além destes testes, na Farmácia Saúde, é, também, possível determinar o INR (Relação Internacional Normalizada) com recurso ao CoaguChek<sup>®</sup> XS da Roche Diagnostics, medição essencial para a monitorização de doentes com terapêutica

anticoagulante com antagonistas da vitamina K, nomeadamente, na terapêutica com Varfarina. Um teste bastante utilizado é análise rápida à urina, utilizando as tiras Combur Test® UX e recorrendo ao aparelho Urysis 1100® analizer, da Roche Diagnostics, para resultados quantitativos mais precisos, sendo este um importante meio auxiliar de apoio ao diagnóstico de infeções urinárias, como apresento no Caso Clínico 4.5. A realização destes serviços ao longo do estágio disponibilizou-me uma maior diversidade de interações com o utente, visto que, ao decorrerem no gabinete de atendimento, conferem maior privacidade, sentindo-se o utente mais confortável a abordar determinadas questões, que, por variados motivos, não colocaria ao balcão.

Encontra-se, também, disponível o serviço de PIM, em que a medicação do utente é organizada semanalmente ou mensalmente, em tabuleiros estanques e devidamente selados a frio, com base na tabela terapêutica do utente e cumprindo as especificações da Norma Geral N° 30-NGE-00-010-02 de 09/10/2018 da Ordem dos Farmacêuticos<sup>[3]</sup>. Este serviço é bastante relevante na promoção da adesão à terapêutica, sendo direcionado, essencialmente a idosos polimedicados com dificuldades em gerir a sua própria medicação. Antes da execução da PIM, é feita uma revisão da medicação, revisão esta que realizei com as farmacêuticas responsáveis por este serviço. Durante a realização desta tarefa tive a oportunidade de rever conhecimentos adquiridos nas unidades curriculares de Farmacologia I e II e de Farmácia Clínica.

Por último, gostaria de referir um serviço que considero de elevada importância: o Serviço Farmacêutico de Ensino e Verificação da Técnica Inalatória (SFEVTI). Este serviço consiste, resumidamente, em ensinar ao utente a técnica inalatória, verificar se o mesmo a compreendeu e se a consegue executar corretamente, através da respetiva demonstração e reavaliação ao longo da terapêutica. Uma vez que existe uma grande variedade de dispositivos inalatórios no mercado e, sendo que, cada um apresenta determinadas especificidades na sua utilização, a terapêutica, muitas das vezes, acaba por ficar comprometida, porque o utente não consegue utilizar o seu dispositivo corretamente. Desta forma, para além de considerar que este serviço é muito importante para o utente, considero que foi, também, uma mais valia para mim, uma vez que me permitiu, contactar com os diversos dispositivos inalatórios e me tornou mais apta a responder às questões que foram surgindo durante os atendimentos.

### **3.1.6. Medicamentos Manipulados**

A preparação de medicamentos manipulados esteve desde sempre intrinsecamente ligada à profissão farmacêutica. Contudo, nas últimas décadas, tem-se demonstrado uma

prática cada vez menos frequente, devido à industrialização do processo de produção do medicamento. Na minha opinião, essa tendência deve ser contrariada, uma vez que a manipulação é uma ferramenta que permite a personalização da terapêutica (tal como apresentado no Caso Clínico 4.3) de forma a dar resposta às necessidades do utente. Tal apresenta-se como uma vantagem perante a indústria farmacêutica valorizando, assim, o setor da farmácia comunitária.

Ao longo do meu estágio tive a oportunidade de participar na preparação de algumas formas farmacêuticas, tais como suspensões, cremes e cápsulas. Considero que esta prática foi essencial para relembrar alguns conteúdos lecionados na unidade curricular de Farmácia Galénica e aprofundar os meus conhecimentos na área da manipulação do medicamento.

### **3.1.7. Desafios Impostos pela Equipa**

Ao longo do estágio, a equipa da Farmácia Saúde incentivou-me a desenvolver as minhas funções de forma autónoma, mas também a aprofundar os meus conhecimentos em várias áreas de aconselhamento ao utente, que me valorizam enquanto profissional de saúde. Assim, além das atividades inerentes à Farmácia Comunitária, participei em diversas formações e elaborei alguns trabalhos de pesquisa. Um dos desafios propostos, foi a elaboração de um quadro resumo com os fármacos indicados para o tratamento de Parasitoses Intestinais. Neste trabalho descrevi a indicação de cada medicamento e a posologia para as diferentes faixas etárias, mas, também, possíveis observações e considerações à sua utilização. Ao realizar este trabalho, que consta nos Anexos, tive um contacto mais aprofundado com este tipo de terapêutica podendo relembrar e consolidar conhecimentos adquiridos na unidade curricular de Parasitologia e Análises Parasitológicas.

## **3.2. Pontos Fracos**

### **3.2.1. Falta de Prática e Insegurança Inicial**

Apesar da realização prévia de estágio de verão em farmácia comunitária senti, inicialmente, uma grande insegurança no atendimento ao público. Atualmente, o utente não exige apenas um atendimento de qualidade, mas, também, que o mesmo seja realizado no menor tempo possível. Assim, senti alguma dificuldade inicial em transmitir a informação correta ao utente, enquanto realizar as tarefas logísticas próprias da dispensa no sistema informático.

Contudo, com o auxílio da equipa da Farmácia Saúde, aprendi a encarar cada desafio como uma oportunidade nova de aprendizagem. Assim, rapidamente ultrapassei este



obstáculo e pude concentra-me em adquirir e consolidar novos conhecimentos, alcançado maior autonomia e segurança no atendimento ao público.

### **3.2.2. Não Realização da Consulta de Acompanhamento Farmacoterapêutico**

Além dos serviços farmacêuticos explanados anteriormente, a Farmácia Saúde coloca ao dispor dos seus utentes consultas Acompanhamento farmacoterapêutico. Nestas consultas é realizada uma avaliação cuidada a toda a medicação do utente e das patologias associadas, segundo critérios e *guidelines* adequadas. Assim, cada medicamento é classificado no que diz respeito à sua segurança, efetividade e necessidade, detetando possíveis duplicações, interações farmacoterapêuticas e problemas relacionados com a medicação.

Devido à pandemia causada pelo SARS-CoV-2, a farmácia viu-se forçada a suspender todos os serviços farmacêuticos diferenciados, incluindo as consultas de acompanhamento farmacoterapêutico, durante o estado de calamidade e respetivo período de contingência. Tal levou a que não tivesse a oportunidade de assistir a este tipo de consulta durante o estágio. Não obstante, os colegas prestaram-me uma explicação detalhada da forma como decorre a consulta e o tipo de questões que, por norma, avaliam, podendo, assim, recordar alguns conhecimentos adquiridos na unidade curricular de Farmácia Clínica.

## **3.3. Oportunidades**

### **3.3.1. Participação em Formações**

É imperativo que o farmacêutico esteja em constante formação, de forma a poder estar a par das mais recentes inovações e, assim, oferecer ao utente um serviço diferenciado e de elevada qualidade. Para auxiliar esta tarefa, existem diversas formações disponíveis, algumas internas, dadas por colegas da farmácia, outras prestadas pelos mais diversos laboratórios. Assim sendo, ao longo do estágio, tive a oportunidade de participar em diversas formações, onde foram abordados temas como o vírus SARS-CoV-2 e o surto da COVID-19, mas, também, suplementação em animais, desnutrição em idosos, tratamento da dor, homeopatia, dispositivos inalatórios, entre outros. Assisti, também, a apresentações de linhas de produtos de dermocosmética das marcas ISDIN®, La Roche Posay® e Martiderm®.

Este tipo de iniciativas permitiu-me consolidar alguns conhecimentos prévios e adquirir outros, uma vez que, possibilitou o meu contacto com uma maior variedade de produtos e com as suas especificidades. Fiquei, assim, mais apta a disponibilizar ao utente informações mais atualizadas, permitindo assim um atendimento mais personalizado e completo. Além disso adquiri também durante essas formações, conhecimentos na área comercial, tendo desenvolvido, ao longo do estágio, algumas técnicas de venda,

nomeadamente o *cross-selling* e *up-selling*, que são essenciais para a sustentabilidade da farmácia.

### **3.3.2. Unidade Curricular de Gestão de Informação em Saúde**

Ainda que o MICF tenha um extenso e diversificado plano curricular, é inevitável que não sejam abordados todos os temas necessários ao estágio e, mesmo, ao Farmacêutico Comunitário. Ao realizar um estágio de verão, no 4º ano, apercebi-me que uma das maiores lacunas da minha formação estava relacionada com o aconselhamento de MNSRM e produtos de saúde e bem-estar. Neste sentido, decidi, no 5º ano, escolher a unidade curricular de Gestão de Informação em Saúde, como opcional.

Nesta unidade curricular abordamos diversos novos temas, como saúde animal e desparasitação, homeopatia, ortopedia, entre outros. As aulas lecionadas pela regente da unidade curricular e por alguns farmacêuticos convidados, foram uma mais valia para a minha formação, pois permitiram-me adquirir e consolidar novos conhecimentos, que vim a aplicar durante o estágio.

## **3.4. Ameaças**

### **3.4.1. Pandemia de SARS-CoV-2**

Devido à pandemia de SARS-CoV-2, foi declarado, em Portugal, situação de estado de emergência a 20 de março do presente ano. Por essa altura, a Farmácia Saúde passou a fazer atendimento, de forma exclusiva, pelo postigo e a equipa foi dividida em dois grupos que trabalhavam de forma alternada. A fim de proteger os seus alunos, a Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra suspendeu todas as atividades letivas presenciais. Consequentemente, o estágio foi suspenso de dia 20 de março a 4 de maio. Ao retomarmos o estágio, nós, estagiárias, fomos divididas pelas duas equipas que trabalhavam alternadamente, o que significou que só poderíamos estagiar em semanas intercaladas durante o mês de maio, de forma a cumprir as regras de segurança do plano de contingência interno. Adicionalmente, após este período, de forma a evitar aglomerações dentro da farmácia e devido à vasta equipa, foi nos proposto estagiarmos apenas 2 a 3 dias por semana. Todos estes fatores atrasaram o processo de aprendizagem. Visto que, à data de interrupção do meu estágio, já me encontrava numa fase de consolidação de conhecimento, em que já sentia alguma segurança e autonomia nas minhas tarefas, a paragem na atividade vez com que, ao voltar, tivesse de relembrar muitos dos conhecimentos já adquiridos, para posteriormente os poder efetivamente consolidar.

### **3.4.2. Plano Curricular do MICF**

O plano curricular do MICF apresenta um grande leque de unidades curriculares que permitem ao aluno construir uma boa base de conhecimentos em diversos ramos do setor farmacêutico. Porém, ao colocar em prática a formação teórica recebida, identifiquei algumas lacunas que, em certa parte, comprometeram o meu desempenho no estágio e que considero que poderiam ser facilmente colmatadas. Os pontos que considero mais relevantes referir são os poucos conhecimentos adquiridos durante o curso nas áreas de gestão farmacêutica e nutrição, assim como, o conhecimento pouco aprofundado de suplementos alimentares e de produtos de veterinária.

Relativamente à área da gestão farmacêutica, esta revela-se uma constante, não só no dia a dia da farmácia, mas, também, acaba por ter um papel fundamental na definição de objetivos, a curto e a longo prazo. No entanto, apesar de essencial à sustentabilidade da farmácia, considero que, ao longo da minha formação académica, foi uma área com a qual tive pouco contacto.

Do mesmo modo, o aconselhamento nas áreas de nutrição humana e suplementação alimentar é solicitado por muitos utentes, sendo que há, neste caso, uma grande e diversificada oferta de produtos. No entanto, no início do estágio, foi notório o meu desconhecimento nesta área, o que causou grande dependência na equipa da farmácia para me ajudar a responder às necessidades que me eram apresentadas pelo utente. O mesmo se verificou em relação aos produtos e medicamentos de uso veterinário. Considero, por isso, que o plano das unidades curriculares onde são abordados estes temas se poderia aproximar um pouco mais da realidade característica da farmácia comunitária.

Não obstante, e a fim de colmatar estes obstáculos, procurei aprofundar os meus conhecimentos através de esclarecimentos de dúvidas com a equipa da Farmácia Saúde e através da participação em formações relacionadas com estes temas.

### **3.4.3. Iliteracia em Saúde**

Segundo a Organização Mundial de Saúde, literacia em saúde define-se com o conjunto de “competências cognitivas e sociais que determinam a motivação e capacidade dos indivíduos acederem, perceberem e usarem informação de forma a promover e manter boa saúde”<sup>[4]</sup>. Assim sendo, enquanto profissionais de saúde especialistas do medicamento, temos o dever não só ceder os medicamentos solicitados, mas, também, de dispensar as informações relativas à sua segurança e correta utilização, de modo a promover o uso racional e adequado do medicamento.

Vários foram os casos que refletiram a desinformação da população em relação ao medicamento. Por exemplo, foi-me solicitada, algumas vezes, a cedência de MNSRM com base em publicidade ou por conselhos de familiares e/ou amigos e não com base em informação científica fidedigna, sendo que muitas vezes não era a solução mais indicada para a condição apresentada. Outra questão bastante comum é o ceticismo perante medicamentos genéricos, apresentando a premissa de que tem de existir uma razão pelo qual é mais barato, insinuando a menor qualidade do mesmo e não aceitando ou compreendendo a real razão que lhes apresentava para a diminuição do custo.

Por fim, a situação mais recorrente é a solicitação de MSRM sem apresentação de receita médica válida. Sendo possível verificar que não compreendiam o conceito de MSRM, uma vez que afirmavam que não sendo compartilhado, o medicamento não necessita de receita para ser dispensado. A título de exemplo, apresento o Caso Clínico 4.2. Aquando da explicação da necessidade de receita e dos possíveis riscos associados à utilização do medicamento sem acompanhamento médico, entre outros, os utentes não compreendiam e demonstravam a sua insatisfação de forma a destabilizar o ambiente calmo da farmácia, causando desconforto tanto a mim, como aos restantes utentes.

## **4. Casos Clínicos**

### **4.1. Congestão Nasal**

Um senhor, com cerca de 50 anos, pediu Nasorhinathiol<sup>®</sup> (cloridrato de oximetazolina 25 mg/ml solução). Ao questionar se tinha congestão nasal e há quanto tempo, respondeu-me que já utilizava o produto há alguns meses e que aplicava, todas as noites, uma pulverização em cada narina. Afirmava que, caso não o fizesse, não conseguia respirar e, consequentemente, não conseguia dormir. Apercebi-me, então, que o utente estava a sofrer do chamado efeito *rebound* característico do uso prolongado dos descongestionantes, que devido ao seu efeito vasoconstritor, não devem ser utilizados mais do que 3 a 4 dias. Assim, aconselhei-o a proceder à diminuição gradual do uso do descongestionante nasal, recorrendo à utilização de um corticosteroide inalado (budesonida 64 mcg/dose), de modo a diminuir a inflamação nasal até que o utente consiga suspender a utilização do descongestionante tópico nasal<sup>[5]</sup>.

### **4.2. Não cedência de Eutirox<sup>®</sup>**

Um senhor apresenta-me a caixa do Eutirox<sup>®</sup> 75 mcg e pede-me para lhe ceder uma outra. Questionei se tinha receita médica para o levantar e há quanto tempo fazia o medicamento em questão, ao que me respondeu que era para a esposa e que esta já fazia o

há mais de dois anos. Após ter confirmado que a utente não tinha histórico na farmácia e que não apresentava receita válida, questionei quando tinha sido a última consulta médica e a última vez que tinha feito análises, ao que me respondeu “já nem me lembro”. Expliquei ao utente os riscos associados da administração da levotiroxina sem acompanhamento médico, nomeadamente por se tratar de um medicamento de margem terapêutica estreita, que exige monitorização regular. Visto o senhor referir que a esposa tinha alguns comprimidos em casa, aconselhei a marcação de consulta médica para nova avaliação. No entanto, a sugestão não foi bem aceite e o senhor saiu demonstrando o seu descontentamento.

### **4.3. Necessidade de Medicamento Manipulado**

A mãe de uma criança de 12 anos apresentou uma receita para o Elvanse<sup>®</sup> 30 mg, em cápsulas. Como a posologia não se encontrava descrita na receita, perguntei se a médica a tinha indicado verbalmente, ao que a mãe me responde que, devido ao peso da criança, apenas poderia administrar metade da dosagem e mostrou-me uma folha com as seguintes indicações: “Abrir a cápsula, despejar em 10 ml de água e mexer bem. Com o auxílio de uma seringa retirar 5 ml para administrar e descartar o restante”. Ao ler estas indicações, surgiram-me diversas questões visto que, da forma descrita, não conseguiríamos garantir que a farmacocinética e farmacodinâmica do princípio ativo se mantivessem inalteradas, nem sequer garantir que a criança tomasse sempre a mesma dose, uma vez que, seguindo as indicações, surgiria uma mistura da qual não havia estudos de estabilidade ou qualquer avaliação das propriedades físico-químicas ou da sua efetividade e/ou segurança. Em discussão com a Diretora Técnica Dra. Anabela Mascarenhas e com a colega responsável pela preparação dos medicamentos manipulados, chegamos à conclusão que a forma mais segura de administração seria recorrer às cápsulas originais de 30 mg e preparar, a partir delas, cápsulas com 15 mg e, assim, a criança poderia tomar uma cápsula por dia, sem nenhum dos riscos indicados anteriormente. A mãe concordou com a solução e assim garantimos a estabilidade, segurança e efetividade da terapêutica instituída.

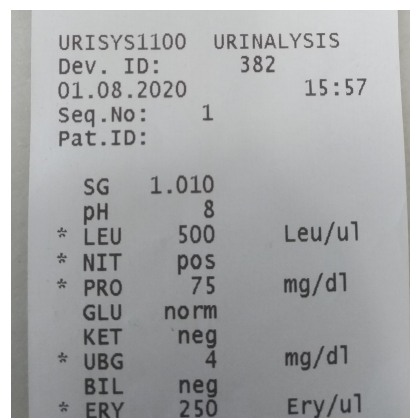
### **4.4. Insuficiência Venosa**

Uma utente, com cerca de 70 anos, queixa-se de ter a pele das pernas muito seca, apesar de aplicar creme hidratante todos os dias à noite, e indica ter, também, prurido que se intensifica à noite. Seguidamente, questionei se os sintomas que me indicava se limitavam apenas à zona abaixo dos joelhos e se durante a noite sentia esta zona muito quente, ao que me respondeu positivamente. Com isto, informei-a que poderia ser insuficiência venosa e, nessa sequência, respondeu-me que tinha muitas “varizes” e que a médica de família já lhe

tinha indicado meias de compressão, no entanto não as conseguia vestir. Expliquei-lhe que essa era, de facto, uma alternativa eficaz para o controlo da insuficiência venosa e apresentei-lhe algumas estratégias para facilitar essa tarefa. Indiquei, ainda, que poderia iniciar a toma de um protetor vascular e venotrópico, como a fração flavonóica purificada micronizada de bioflavonóides, dado que não tinha qualquer contraindicação para o fazer e está indicado no alívio dos sintomas descritos, uma vez por dia, e que poderia associar a utilização do polissulfato sódico de pentosano em gel (Thrombocid® Gel), fazendo uma massagem de baixo para cima, no sentido do pé para o joelho, de modo a facilitar o retorno venoso.

#### 4.5. Infecção Urinária

Uma senhora solicitou uma embalagem de fosfomicina 3 g, com duas saquetas. Sendo um antibiótico e MSRM, questionei se tinha receita médica, ao que respondeu que não. Acrescentou que a filha de 17 anos apresentava sintomas de infecção urinária, que incluíam ardor intenso ao urinar e peso na bexiga. Como era sábado, não conseguia consulta no centro de saúde e tinha algum receio de se dirigir às urgências do hospital devido à presente pandemia. Assim, decidi entrar em contacto com a médica família, que lhe indicou o medicamento referido mas, de momento, não tinha possibilidade de enviar a receita. Consequentemente, propus fazer uma análise rápida à urina, utilizando as tiras Combur Test® UX e recorrendo ao aparelho Urysis 1100® analyzer, como os resultados demonstraram pH da urina básico e presença de leucócitos e nitritos – Figura 1, entrei em contacto com a médica em questão, que me facultou o seu nome e número de carteira profissional, confirmando a terapêutica e posologia. Assim sendo e recorrendo à Deliberação 133/2012<sup>[6]</sup>, fiz uma venda suspensa do medicamento originalmente pedido e, na segunda feira seguinte, a utente trouxe a receita médica válida para regularizar a cedência.



Parameter	Result	Unit
URISYS1100	URINALYSIS	
Dev. ID:	382	
01.08.2020	15:57	
Seq.No:	1	
Pat.ID:		
SG	1.010	
pH	8	
* LEU	500	Leu/u1
* NIT	pos	
* PRO	75	mg/dl
GLU	norm	
KET	neg	
* UBG	4	mg/dl
BIL	neg	
* ERY	250	Ery/u1

**Figura 1** – Resultado do teste rápido à urina.

## **5. Considerações Finais**

Terminada a última etapa do MICF, posso afirmar que o Estágio Curricular teve um impacto preponderante na minha formação, permitindo consolidar e complementar conhecimentos científicos adquiridos ao longo do curso, transpondo-os para a atividade prática. No entanto, vivenciei, também, grande crescimento pessoal, através do contacto com diferentes personalidades, que requerem uma constante adaptação da postura e do discurso.

Ao longo do estágio tive a oportunidade de entrar em contacto com o dia a dia do Farmacêutico Comunitário. Realizei diversas as funções inerentes à profissão e contactei com a realidade desafiante de interagir com a população, que implica uma atualização constante dos conhecimentos e a procura contínua da melhor forma de os transmitir ao utente que se apresenta diante de nós. Contudo, é uma atividade extremamente gratificante, uma vez que através da aplicação dos nossos conhecimentos, é possível ter um impacto direto na promoção e manutenção da saúde do utente.

Com a ajuda incondicional da equipa da Farmácia Saúde, acabo o estágio com a sensação de um trabalho bem feito. Ao longo destes sete meses de estágio ganhei autonomia, confiança e sentido de responsabilidade, colecionando as ferramentas necessárias para enfrentar o desafio que depara perante os meus olhos: ser Farmacêutica.

## Referências Bibliográficas

- [1] DECRETO-LEI n° 168/2007. **D.R. Série I.** (2007-08-31).
- [2] PORTARIA n.º 97/2018. **D.R. Série I 69/2018.** (2018-05-09).
- [3] Norma Geral N° 30-NGE-00-010-02. 2018 – **Preparação Individualizada da Medicação (PIM).** Lisboa: Ordem dos Farmacêuticos.
- [4] WHO - WORLD HEALTH ORGANIZATION – **Track 2: Health literacy and health behaviour.** Genebra: WHO, s.d. [Acedido a 11 de agosto de 2020]. Disponível na Internet: <https://www.who.int/healthpromotion/conferences/7gchp/track2/en/>
- [5] INFARMED, I.P. – **Resumo das Características do Medicamento - Nasorhinathiol 0,5 mg/ml gotas nasais, solução.** Infomed, 2017. [Acedido a 25 de agosto de 2020]. Disponível na Internet: <https://extranet.infarmed.pt/INFOMED-fo/pesquisa-avancada.xhtml>
- [6] DELIBERAÇÃO n.º133/2012. INFARMED, I.P. (2012-10-04).



## Anexo

### Documento I – Terapêutica de Parasitoses Intestinais.

#### Terapêutica de Parasitoses Intestinais

Fármaco	Indicação terapêutica	Posologia	
Combantrin® 50mg/ml (pirantel)  MNSRM	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Oxiúros (<i>Enterobius vermicularis</i>)</li> <li>- Ancilóstomo (<i>Ancylostoma duodenale</i>, <i>Necator americanus</i>)</li> <li>- Lombrigas (<i>Ascaris lumbricoides</i>)</li> </ul>	Adultos e Crianças >24 meses <sup>(1)</sup> : - 10 mg/kg em toma única: - <12 kg: 2,5 ml; - 12-22 kg: 2,5-5 ml; - 22-41 kg: 5-10 ml; - 41-75 kg: 10-15 ml; - >75 kg: 20 ml.	Gravidez: - Evitar o tratamento. Amamentação: - Evitar o tratamento; - Caso seja feito, rejeitar o leite.  Em infestação por <i>Enterobius vermicularis</i> (Oxiúros) deve ser feita limpeza da roupa e do quarto e desparasitação do agregado familiar.  Em casos específicos com infestação por <i>Necator americanus</i> e <i>Ascaris lumbricoides</i> a posologia pode ser diferente.
Flagyl® 250 mg (metronidazol)	- <i>Giardia lamblia</i>	Crianças com >24 meses <sup>(1)</sup> : - 15 mg/kg/dia até dose máxima de 750 mg, 3 x dia, entre 5 a 7 dias <sup>(2)</sup> .  Adultos: - 3 cp id durante 5 a 7 dias.	Gravidez: - Contra indicado no 1º trimestre de gravidez; - Durante o resto da gravidez deve ser evitado. Amamentação: - Evitar o tratamento; - Caso seja feito, rejeitar o leite.  Urina pode escurecer. Pode levar ao desenvolvimento de candidíase.  O Flagyl potência a ação de agentes anticoagulantes.
	- Amebas (Amebíase intestinal)	Crianças com >24 meses <sup>(1)</sup> : - 15 mg/kg/dia até dose máxima de 750 mg, 3 x dia, entre 5 a 7 dias <sup>(2)</sup> .  Adultos: - 3 ½ cp 8/8h durante 7 a 10 dias.	
Flagentyl® 500mg (secnidazol)	- <i>Giardia lamblia</i>	Crianças com >24 meses <sup>(1)</sup> : - 25-30 mg/kg em toma única.  Adultos: - 4 cp em toma única.	O Flagentyl potência a ação de agentes anticoagulantes.
	- Amebas (Amebíase intestinal)	Crianças com >24 meses <sup>(1)</sup> : - 25-30 mg/kg em toma única.  Adultos: - 4 cp em toma única.	
Pantelmin® (mebendazol) - Comprimidos 100 mg - Suspensão oral 20 mg/ml  MNSRM	- Oxiúros ( <i>Enterobius vermicularis</i> )	Adultos e crianças com >24 meses <sup>(1)</sup> : - 1 cp ou 5ml em toma única Repetir passado 2 a 4 semanas (reinfestação é frequente).	Gravidez: - Evitar o tratamento. Amamentação: - Evitar o tratamento; - Caso seja feito, rejeitar o leite.  Em infestação por <i>Enterobius vermicularis</i> (Oxiúros) deve ser feita limpeza da roupa e do quarto e desparasitação do agregado familiar.

Pantelmin® (continuação)	- Ancilóstomos ( <i>Ancylostoma duodenale</i> , <i>Necator americanus</i> )	Adultos e crianças com >24 meses <sup>(1)</sup> : - 1 cp ou 5ml 12/12h durante 3 dias.	Em infestação por <i>Trichuris trichiura</i> ou <i>Ancylostoma duodenale</i> , <i>Necator americanus</i> a terapêutica pode ser associada a suplementação de ferro.
	- Lombrigas ( <i>Ascaris lumbricoides</i> )		
	- Tricocéfalos ( <i>Trichuris trichiura</i> )		
	- <i>Strongyloides stercoralis</i>	Crianças com >24 meses <sup>(1)</sup> : - 1 cp ou 5ml 2 vezes ao dia durante 3 dias.  Adultos: - 2 cp ou 10ml 12/12h durante 3 dias.	
Zentel® (albendazol) - Comprimidos 400 mg - Suspensão oral 20 mg/ml	- <i>Giardia lamblia</i>	Adultos e crianças com >24 meses <sup>(1)</sup> : - 1 cp ou 20 ml (1 frasco) id durante 5 dias.	Gravidez: - Contra indicado (fazer teste de gravidez). Amamentação - Não existe informação disponível.  Em infestação por <i>Enterobius vermicularis</i> (Oxiúros) deve ser feita limpeza da roupa e do quarto e desparasitação do agregado familiar.  Em infestação por <i>Trichuris trichiura</i> ou <i>Ancylostoma duodenale</i> , <i>Necator americanus</i> a terapêutica pode ser associada a suplementação de ferro.  Em infestação por <i>Trichuris trichiura</i> pode ser necessário fazer a administração durante 3 dias consecutivos em caso de infestação abundante.
	- Lombrigas ( <i>Ascaris lumbricoides</i> )	Adultos e crianças com >24 meses <sup>(1)</sup> : - 1 cp ou 20 ml (1 frasco) em toma única.	
	- Tricocéfalos ( <i>Trichuris trichiura</i> )		
	- Oxiúros ( <i>Enterobius vermicularis</i> )		
	- Ancilóstomos ( <i>Ancylostoma duodenale</i> , <i>Necator americanus</i> )		
	- Tênia ( <i>Hymenolepis nana</i> , <i>Taenia spp</i> )	Adultos e crianças com >24 meses <sup>(1)</sup> : - 1 cp ou 20 ml (1 frasco) 12/12h durante 3 dias <sup>(3)</sup> . No caso de <i>Hymenolepis nana</i> o tratamento é repetido 10 a 21 dias depois.	
- <i>Strongyloides stercoralis</i>			
Ivermectina® (manipulado)	- <i>Strongyloides stercoralis</i>	Crianças com >15 kg: - 200 µg/kg id durante 2 dias.	

Fasigyn 500 mg (tinidazol) encontra-se descontinuado.

<sup>(1)</sup> Casos com crianças com menos de 2 anos têm de ser analisados.

<sup>(2)</sup> Dose mais baixa encontrada na literatura consultada

<sup>(3)</sup> Dose indicada na norma da DGS - Abordagem Diagnóstica e Terapêutica das Parasitoses em Idade Pediátrica (2017)

Bibliografia:

Fernandes, S., Beorlegui, M., Brito, M. J. & Rocha, G. *Protocolo de parasitoses intestinais*. 35–41 (2008).

Henrique, F. & George, M. Norma DGS no 006/2017 de 12/06/2017 | *Abordagem Diagnóstica e Terapêutica das Parasitoses em Idade Pediátrica*. 1–17 (2017).

INFARMED, Autoridade Nacional do Medicamento e Produtos de Saúde. *Prontuário Terapêutico - 10*. (2011).

INFARMED, I.P. – Resumo Das Características Do Medicamento - Flagentyl 500 mg. Infomed, 2017. [Acedido a 2 de fevereiro de 2020]. Disponível na Internet:

[http://app7.infarmed.pt/infomed/download\\_ficheiro.php?med\\_id=3422&tipo\\_doc=rcm](http://app7.infarmed.pt/infomed/download_ficheiro.php?med_id=3422&tipo_doc=rcm)

INFARMED, I.P. – Resumo Das Características Do Medicamento - Combantrin 50 mg/ml. [Acedido a 2 de fevereiro de 2020] Disponível na Internet:

[http://app7.infarmed.pt/infomed/download\\_ficheiro.php?med\\_id=2118&tipo\\_doc=rcm](http://app7.infarmed.pt/infomed/download_ficheiro.php?med_id=2118&tipo_doc=rcm)

INFARMED, I.P. – Resumo Das Características Do Medicamento - Zentel 400 mg. [Acedido a 2 de fevereiro de 2020] Disponível na Internet:

[http://app7.infarmed.pt/infomed/download\\_ficheiro.php?med\\_id=9424&tipo\\_doc=rcm](http://app7.infarmed.pt/infomed/download_ficheiro.php?med_id=9424&tipo_doc=rcm)

INFARMED, I.P. – Resumo Das Características Do Medicamento - Pantelmin 100 mg. [Acedido a 2 de fevereiro de 2020]. Disponível na Internet:

[http://app7.infarmed.pt/infomed/download\\_ficheiro.php?med\\_id=6634&tipo\\_doc=rcm](http://app7.infarmed.pt/infomed/download_ficheiro.php?med_id=6634&tipo_doc=rcm)

INFARMED, I.P. – Resumo Das Características Do Medicamento - Flagyl 250mg. [Acedido a 2 de fevereiro de 2020]. Disponível na Internet:

[http://app7.infarmed.pt/infomed/download\\_ficheiro.php?med\\_id=3423&tipo\\_doc=rcm](http://app7.infarmed.pt/infomed/download_ficheiro.php?med_id=3423&tipo_doc=rcm)

## **Parte II**

### **Inibição do Sistema QS dependente de AI-2 como Terapia Antivirulência**

## Resumo

A resistência bacteriana a antibióticos é dos problemas que mais preocupa os sistemas de saúde a nível mundial. Sendo que, a velocidade de desenvolvimento desta é maior que a de aparecimento de novos antibióticos, surge, assim, a necessidade de encontrar novas abordagens para prevenir e tratar doenças infecciosas causadas por bactérias.

O *Quorum Sensing* (QS) é um processo que permite que as bactérias comuniquem entre si, podendo, assim, sincronizar o seu comportamento com base na densidade populacional. Sendo que, a comunicação é possível devido a pequenas moléculas sinalizadoras, denominadas de auto-indutores (AI). Os AIs mais comuns, nas bactérias Gram negativo, são as acil-homoserina lactonas e, nas bactérias Gram positivo são os peptídeos auto-indutores. No entanto, existe um AI universal, descrito tanto em bactérias Gram negativo como Gram positivo: o auto-indutor-2 (AI-2).

Estes diferentes sistemas de QS regulam a expressão de vários genes, culminando em alterações fenotípicas, que se encontram intimamente relacionadas com a patogenicidade das bactérias. Assim, um maior conhecimento destes sistemas permitirá o desenvolvimento de novas terapias que interfiram com a comunicação, e, conseqüentemente, com o decurso da infeção.

Vários são os alvos existentes no sistema de QS dependente de AI-2 para os compostos inibidores. No entanto, estes não se encontram diretamente relacionado com processos essenciais ao crescimento das bactérias, o que faz com que a pressão seletiva exercida por estas abordagens seja baixa. Assim, é expectável que a velocidade de desenvolvimento de resistência seja menor do que a que se registou para os antibióticos tradicionais.

Muitos compostos sintéticos e naturais têm sido descritos como inibidores do sistema de QS dependente de AI-2, sendo que os mecanismos de ação de alguns já são conhecidos. Existe ainda muito trabalho a fazer nesta área mas estas são abordagens têm muito potencial.

**Palavras-chave:** *Quorum Sensing*, Auto-indutor-2, Inibição, Resistência Bacteriana.

## **Abstract**

Drug resistance in bacteria is one of the most concerning problems for health care systems worldwide. Since the speed of drug resistance's emergence is greater than that of development of new antibiotics, there is a need to find new approaches to prevent and treat bacterial infectious diseases.

Quorum Sensing (QS) allows bacteria to communicate with each other and synchronize their behavior based on their population density. Communication is due to small signaling molecules: the autoinducers (AI). The most common AIs, in Gram negative bacteria, are acylhomoserin lactones and, in Gram positive bacteria, are autoinducing peptides. However, there is a universal AI, described both in Gram negative and Gram positive bacteria: Autoinducer-2 (AI-2).

The different QS systems regulate the expression of several genes, which leads to phenotypic changes that are closely related to the pathogenicity of bacteria. Thus, a greater knowledge of these systems will allow the development of new therapies that interfere with communication and, consequently, with the course of the infection.

AI-2 quorum sensing have several targets. However, these are not directly related to essential processes to the growth of bacteria, which means that the selective pressure exerted by this approach is low. Thus, the speed of development of resistance will be less than that registered for traditional antibiotics.

Many synthetic and natural compounds have been described as inhibitors of the AI-2-QS system, and some the mechanisms of action are already known. There is still a lot of work to do in this area but these are very promising approaches.

**Keywords:** Quorum Sensing, Autoinducer-2, Inhibition, Drug resistance.

## Lista de Abreviaturas

**AI-2** – Auto-indutor-2

**AIs** – Auto-indutores

**AIP** – Peptídeos auto-indutores, do inglês *Autoinducing Peptides*

**AHL** – Acil-homoserina lactonas

**AMC** – Ciclo Metil Ativado, do inglês *Activated Methyl Cycle*

**CAI-I** – Auto-indutor-I da cólera, do inglês *Cholera autoinducer-I*

**CRISPR-Cas9** – *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats-Cas 9*

**DADMe-Imm-A** – DADMe-Imucilina-A

**DPD** – 4,5-dihidroxi-2,3-pentanodiona;

**DSF** – Fator de Sinal Difusível, do inglês *diffusible signal factor*

**Imm-A** – Imucilina-A

**LuxS** – S-ribosil-homocisteína liase

*Isr* – Operação regulado pela LuxS

**LsrB** – Proteína B regulada pela LuxS

**MTA/SAH nucleosidase ou Pfs** – 5'-metiltioadenosina/S-adenosil-homocisteína nucleosidase

**MTR** – 5'-metiltioribose

**OM** – Otite média

**PQS** – Molécula sinalizadora quinolona da *Pseudomonas*, do inglês *Pseudomonas quinolone signal molecule*

**QS** – *Quorum Sensing*

**SAH** – S-adenosil-homocisteína

**SAM** – S-adenosilmetionina

**SRH** – S-ribosil-homocisteína

**S-THMF-borato** – (2S-4S)-2-metil-2,3,3,4-tetra-hidroxi-hidrofuranona-borato

**R-THMF** – (2R-4S)-2-metil-2,3,3,4-tetra-hidroxi-hidrofuranona

## I. Introdução

Com a descoberta de antibióticos no século XX, muitas doenças infecciosas, que até então eram letais, passaram a ter uma solução terapêutica. No entanto, o seu uso excessivo e indiscriminado associado à capacidade de adaptação e transferência de material genético das bactérias fez surgir um novo problema: estirpes bacterianas multirresistentes (Kalia, 2013; Pereira *et al.*, 2013). Deste modo, hoje em dia, 70% das bactérias são resistentes a um ou mais antibióticos (Haque *et al.*, 2018).

A resistência a antibióticos é um desafio a nível hospitalar que conduz ao aumento da mortalidade, do tempo de internamento e dos custos para os sistemas de saúde, mas não é exclusivo deste (WHO, 2018). Além disso, a taxa de emergência de resistência é mais elevada que a velocidade de desenvolvimento de novos antibióticos, o que significa que o número de infeções bacterianas sem tratamento irá continuar a aumentar (Roy *et al.*, 2011). Surge, então, a necessidade de novas abordagens terapêutica que, preferencialmente, sejam menos suscetíveis à emergência de resistência, como é o caso de inibição de sistemas de *Quorum Sensing* (QS) dependentes do Auto-indutor-2 (AI-2).

QS é um processo amplamente utilizado pelas bactérias. Este permite que comuniquem entre si através de pequenas moléculas denominadas de auto-indutores (AIs), dando-lhes uma noção da densidade populacional. Deste modo, é-lhes possível sincronizar o seu comportamento dentro da população (Teren *et al.*, 2019). Este processo permite que as bactérias atuem como um todo, de forma a ganharem vantagem perante o hospedeiro, podendo, assim, permanecer neste por maiores períodos de tempo.

Existem diferentes classes de auto-indutores, sendo, uma delas o AI-2, uma família de moléculas derivadas da 4,5-dihidroxi-2,3-pentanodiona (DPD). Foram já identificadas em bactérias Gram negativo e Gram positivo, estando envolvidas no controlo processos como a formação de biofilmes, a regulação de fatores de virulência e a síntese de toxinas (Roy *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2019).

A interrupção dos processos de QS permite, então, modular a comunicação entre as bactérias, sendo possível limitar ou alterar a progressão da infeção. Em concreto, a inibição do QS dependente de AI-2 pode reduzir a resistência a antibióticos e bloquear mecanismos que levariam à ativação de fatores de virulência, atenuando a patogenicidade das bactérias (Galloway *et al.*, 2011; Lu *et al.*, 2015; Wang *et al.*, 2019). Estes mecanismos de sinalização são essenciais para a regulação de determinados genes, mas não para a sobrevivência das bactérias. Assim, a sua inibição exerce menor pressão seletiva do que a exercida por terapêuticas bactericidas ou bacteriostáticas, sendo provável que a emergência de resistência seja um processo mais lento (Fleitas Martínez *et al.*, 2018; Schramm, 2018).



## 2. Sistema de Comunicação Quorum Sensing

*Quorum Sensing* (QS) é um mecanismo de comunicação intercelular utilizado por bactérias que lhes permite coordenar a expressão genética com base na densidade populacional. O termo foi proposto pela primeira vez para descrever um comportamento específico das bactérias marinhas, como a *Vibrio fischeri* e a *Vibrio harveyi*. Estas bactérias com base em pequenas moléculas sinalizadoras, os auto-indutores (AIs), conseguem determinar a densidade populacional onde se inserem e, assim, controlar a bioluminescência de forma sincronizada, como um ser único (Bzdrenga *et al.*, 2017; Tang e Zhang, 2014).

Hoje sabemos que o QS é parte integrante de um elevado número de bactérias e que se baseia na síntese, libertação e reconhecimento de AIs, cujo aumento da concentração no meio extracelular se dá em função do crescimento populacional (Teren *et al.*, 2019; Wang *et al.*, 2018). Quando a concentração de AIs atingem um determinado limiar, são acionadas várias cascatas de sinalização nas células, que levam à alteração da expressão de diversos genes que controlam o comportamento bacteriano, permitindo o desenvolvimento de novos fenótipos (Fleitas Martínez *et al.*, 2018; Roy *et al.*, 2011; Teren *et al.*, 2019). Assim, em situações de elevada densidade populacional, as bactérias sincronizam a sua atividade, de forma semelhante ao que acontece em organismos superiores (Kalia, 2013).

Fenómenos biológicos como a formação de biofilme, secreção de fatores de virulência, luminescência celular, resistência a antibióticos e transferência de plasmídeos são alguns exemplos de processos controlados pelos diversos sistemas de QS (Cao *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2018). Por norma, estes processos não são eficazes quando assumidos pelas bactérias individualmente, mas quando ativados de forma sincronizada permite-lhes competir com organismos multicelulares, aumentando a sua probabilidade de sobrevivência (Mangwani *et al.*, 2012). Por exemplo, a *Pseudomonas aeruginosa*, apenas ativa os fatores de virulência quando a população atinge o limiar que lhe permite combater a resposta do sistema imunitário do hospedeiro. Antes de tal acontecer, prefere permanecer como que num estado de dormência (Haque *et al.*, 2018; Kalia, 2013).

Ainda que os passos envolvidos nos diferentes sistemas de QS conhecidos sejam análogos, este mecanismo de comunicação é caracterizado por complexidade e diversidade. Existe uma elevada variedade de moléculas sinalizadoras, algumas específicas de cada espécie e outras mais abrangentes, que desencadeiam diversas funções celulares por indução ou transdução de sinais induzidos por estas (Wang *et al.*, 2018). As próprias bactérias capazes de QS têm uma grande distribuição, sendo que não causam apenas doença no ser humano, estão também presentes na agricultura, aquacultura e criação de animais (Zhao *et al.*, 2018).

Assim, estudos sobre este fenômeno fornecem informações sobre a comunicação intra-espécies em bactérias, mecanismos de regulação de funções fisiológicas e novas abordagens de combate a doenças causadas por bactérias patogênicas (Zhao *et al.*, 2018).

## 2.1. Moléculas Sinalizadoras – Auto-indutores

Os auto-indutores (AIs) são moléculas sinalizadoras que permitem a comunicação intra ou inter-espécies em bactérias, ou seja, que permitem o QS. Por norma, cada AI é específico de uma espécie ou de um número restrito de espécies, não tendo influência na expressão de genes de outras (Defoirdt, 2018).

Vários AIs têm sido identificados, no entanto, podem ser classificados num número limitado de categorias com base nas suas características estruturais. As três principais classes de AIs são: acil-homoserina lactonas (AHL), nas bactérias Gram negativo, peptídeos auto-indutores (AIP, do inglês *Autoinducing Peptides*), nas bactérias Gram positivo e auto-indutor-2 (AI-2), descrito tanto em bactérias Gram negativo como Gram positivo (Brackman e Coenye, 2015; Galloway *et al.*, 2011).

Os AHLs foram primeiramente identificados na *V. fischeri*, na qual controla a bioluminescência. Desde então, já foram identificados em mais de 70 espécies diferentes de bactérias Gram negativo. Estes AIs são constituídos por uma lactona e por uma cadeia alifática lateral de tamanho e natureza variáveis, específicas de cada espécie (Amara *et al.*, 2011; Bzdrenga *et al.*, 2017; Rezzonico *et al.*, 2012). Conseguem atravessar membranas, não dependendo de transportadores, e são detetados por recetores citoplasmáticos que, após ligação com o ligando, ativam a transcrição de genes regulados por QS (Fetzner, 2015) – Figura 1, secção A.

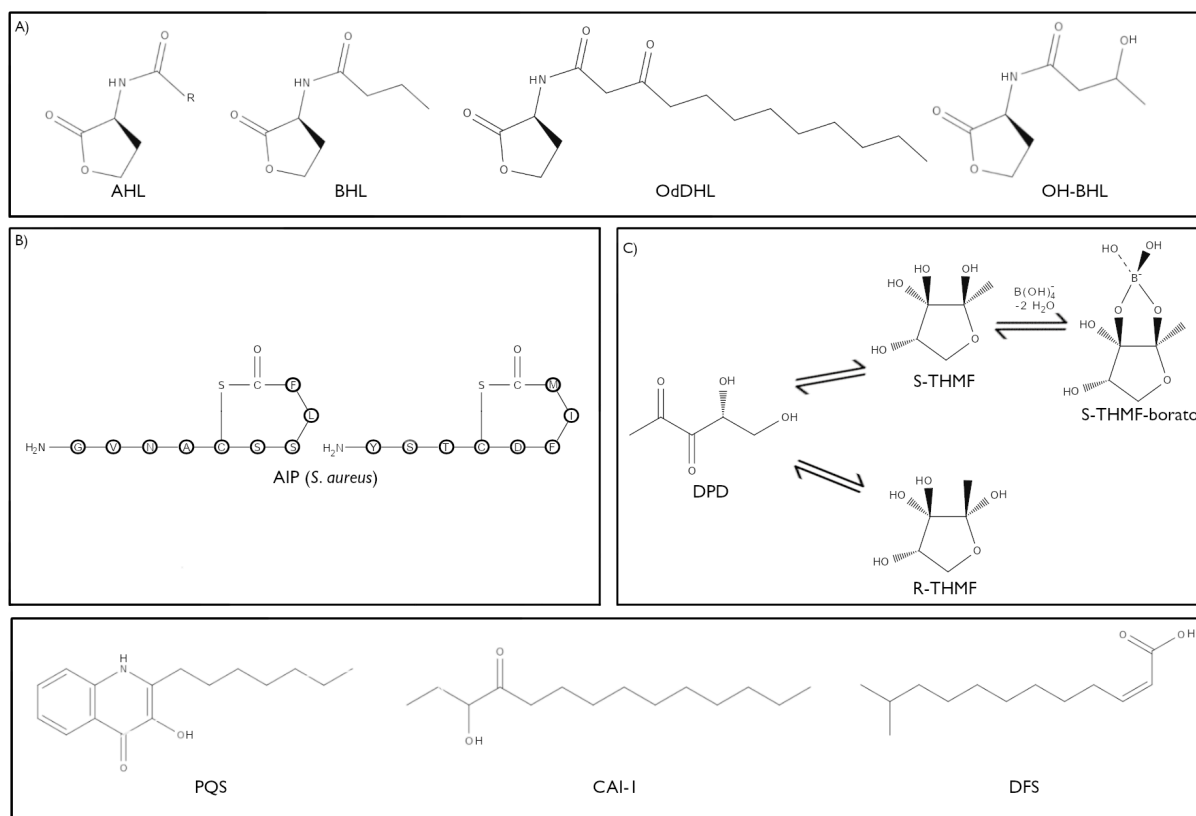
Entre as bactérias Gram positivo, os AIs mais comuns são os AIP. São moléculas lineares ou cíclicas, específicas de cada espécie e estirpe, o que permite apenas comunicações intra-espécies. Dado que não conseguem atravessar a membrana, a sua secreção é medida por transportadores e, na maioria dos casos, durante o transporte, as moléculas sofrem maturação. O AIP é detetado à superfície da célula, por sensores cinase que desencadeiam cascatas de fosforilação para a transdução do sinal, ou no interior da célula, após serem importados por reguladores de resposta que participam na regulação da expressão genética (Bzdrenga *et al.*, 2017; Fetzner, 2015; Tang e Zhang, 2014) – Figura 1, secção B.

Contrariamente ao que acontece com o AHL e com o AIP, o sistema QS dependente de AI-2 foi identificado em bactérias Gram negativo, como as *Vibrio spp.* e a *Escherichia coli*, e em bactérias Gram positivo, como a *Streptococcus pneumoniae*. Adicionalmente, as moléculas

pertencentes a esta classe são interconversíveis e estão em equilíbrio constante, não apresentando uma estrutura rígida específica para cada espécie. Assim, o AI-2 é considerado um auto-indutor universal que permite a comunicação intra e inter-espécies. O AI-2 já foi relacionado com patogenicidade, numa variedade de organismos, e a inibição de QS dependente deste pode dar origem uma terapia de espectro alargado (Defoirdt, 2018; Galloway *et al.*, 2011) – Figura 1, secção C.

No entanto, os AIs não se resumem apenas a estas três categorias. Diversas bactérias apresentam outros sistemas de QS com outras moléculas sinalizadoras, como, por exemplo, a molécula sinalizadora quinolona da *Pseudomonas* (PQS, do inglês *Pseudomonas quinolone signal molecule*) na *Pseudomonas aeruginosa*, o Auto-indutor-I da Cólera (CAI-I do inglês *cholera autoinducer-I*) na *Vibrio cholerae* e o Fator de Sinal Difusível (DSF, do inglês *diffusible signal factor*, derivado de ácidos gordos) nas *Xanthomonas* spp. (Fleitas Martínez *et al.*, 2018; Grandclément *et al.*, 2015; Silva *et al.*, 2015) – Figura 1, secção D.

Geralmente, as bactérias têm apenas um sistema de QS. No entanto, algumas bactérias, maioritariamente Gram negativo, apresentam mais que um. Por exemplo, o sistema QS da bactéria *V. harveyi* integra, num modelo paralelo, três AIs diferentes: AHL, AI-2 e CAI-I. Isto significa que cada AI é ativado de forma independente, mas todos contribuem para a regulação da expressão dos mesmos genes. Contudo, a sua contribuição para esta regulação pode ser diferente. Por outro lado, a *P. aeruginosa* tem dois sistemas de QS, um dependente de AHL e outro de PQS. Aqui, o modelo utilizado é um modelo hierárquico, no qual a ativação do recetor por um AI depende da ativação de outro recetor por um AI diferente (Bzdrenka *et al.*, 2017; Galloway *et al.*, 2011; Tang e Zhang, 2014; Zhao *et al.*, 2018).



**Figura 1 – Auto-indutores.** A – Estrutura geral do AHL, primeira molécula, e alguns exemplos de compostos que se inserem nesta mesma classe; B – 2 exemplos de moléculas AIP, AIs da *Staphylococcus aureus*; C – Precursor do AI-2, DPD, juntamente com o AI-2 da *V. harveyi*, S-THMF-borato, e da *E. coli*, R-THMF; D – exemplos de outros AIs. (Figura adaptada de Brackman e Coenye, 2015; Defoirdt, 2018; Fetzner, 2015).

### 3. AI Universal: Auto-indutor-2

O AI-2 foi detetado pela primeira vez na *V. harveyi*. Observou-se que uma estirpe deficiente em AHL mantinha a capacidade de produzir bioluminescência, sugerindo que existia um segundo AI, de estrutura desconhecida, posteriormente denominado de AI-2. Mais tarde, foi demonstrado que a atividade de uma estirpe dependente de AI-2 da *V. harveyi* podia ser estimulada por fluídos de culturas celulares de várias espécies bacterianas, indicando que este novo AI poderia ser produzido por mais que uma espécie. Posteriormente, foi identificado o gene *luxS*, responsável pela síntese de AI-2, na *V. harveyi*, na *E. coli* e na *Salmonella typhimurium*, confirmando a hipótese anterior. Coincidentemente, hoje em dia, estas são as espécies em que o sistema QS dependente de AI-2 está melhor caracterizado (Galloway *et al.*, 2011; Rui *et al.*, 2012).

A S-ribosil-homocisteína liase (LuxS) catalisa o último passo da síntese de DPD, sendo que alguns autores se referem ao sistema QS dependente de AI-2 como o sistema LuxS/AI-2. Esta enzima está descrita em mais de 500 espécies bacterianas diferentes, sendo altamente conservada, e está envolvida no controlo da expressão de mais de 400 genes

associados a adesão, movimentação, produção de toxinas, entre outros (Jiang *et al.*, 2019; Papenfort e Bassler, 2016; Wang *et al.*, 2018).

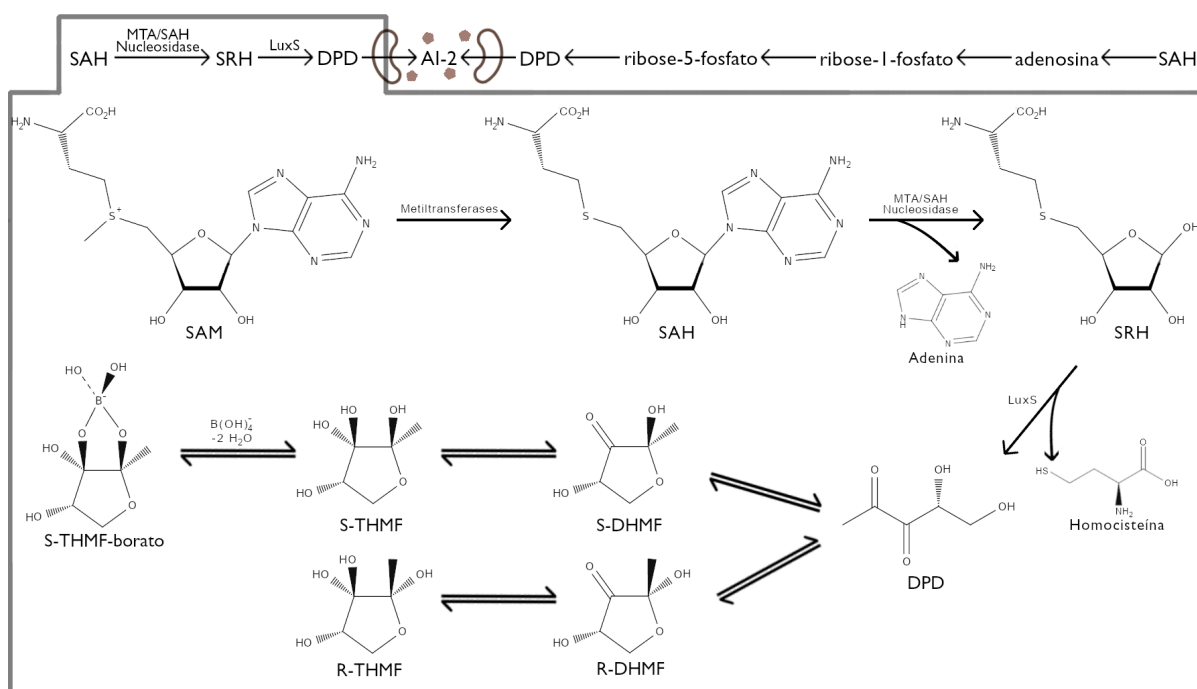
O AI-2 não deve ser encarado como uma molécula única de estrutura bem definida, mas sim como uma família de isómeros com um precursor comum: a molécula DPD. Dois dos isómeros foram identificados como moléculas sinalizadoras: o S-THMF-borato – (2S-4S)-2-metil-2,3,3,4-tetra-hidroxi-hidrofuranona-borato – reconhecido pela *V. harveyi* e o R-THMF – (2R-4S)-2-metil-2,3,3,4-tetra-hidroxi-hidrofuranona – reconhecido pela *S. typhimurium* e a *E. coli* (Zhao *et al.*, 2018).

### 3.1. Síntese do AI-2

A síntese de AI-2 inicia-se com o S-adenosilmetionina (SAM), que, por ação de enzimas metiltransferases, é convertido no intermediário S-adenosil-homocisteína (SAH), uma molécula tóxica. Este, por sua vez, sofre uma reação de hidrólise catalisada pela 5'-metiltioadenosina/S-adenosil-homocisteína nucleosidase (MTA/SAH nucleosidase ou Pfs), dando origem à S-ribosil-homocisteína (SRH) e à adenina. Por fim, a enzima LuxS cliva o SRH em DPD e homocisteína. O DPD, sendo uma molécula instável, origina espontaneamente uma variedade de isómeros interconvertíveis que se mantêm em equilíbrio (Galloway *et al.*, 2011; Roy *et al.*, 2011; Zhao *et al.*, 2018).

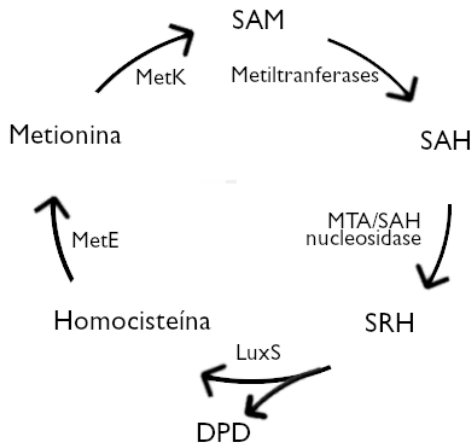
O DPD cicliza e forma dois compostos: o S-DHMF (S-2,4-hidroxi-2-metil-hidro-3-furanona) e o R-DHMF (S-2,4-hidroxi-2-metil-hidro-3-furanona) que, por hidratação, dão origem a S-THMF ((2S-4S)-2-metil-2,3,3,4-tetra-hidroxi-hidrofuranona) e R-THMF, respetivamente. Caso esteja disponível boro em quantidade suficiente, pode dar-se a formação de ésteres boratados, como o S-THMF-borato derivado do S-THMF (Galloway *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2019).

Na maioria das bactérias, a síntese de DPD ocorre pela via descrita anteriormente. No entanto, algumas espécies recorrem a uma outra via independente da LuxS, em que a enzima que catalisa a síntese de AI-2 é a SAH hidrolase (SahH). Tal vem demonstrar que a enzima LuxS não é indispensável à síntese de AI-2 e poderá explicar a existência de bactérias que respondem ao AI, mas não apresentam o gene *luxS* (Wang *et al.*, 2019; Zhao *et al.*, 2018).



**Figura 2 – Vias de síntese de AI-2.** À esquerda encontra-se representada a via de síntese dependente de LuxS acompanhada pelas reações químicas de síntese. À direita está esquematizada a via independente de LuxS. (Figura adaptada de Galloway *et al.*, 2011; Zhao *et al.*, 2018).

Para além da síntese de AI-2, a LuxS tem, também, uma função metabólica, estando envolvida no ciclo metil ativado (AMC, do inglês *activated methyl cycle*) (Zhu e Li, 2012). O AMC é uma importante via metabólica nas células procariontas e eucariotas, responsável pela síntese de SAM e pela desintoxicação de SAH. O SAM é o principal dador do grupo metil, sendo essencial para reações de metilação envolvidas no crescimento e desenvolvimento celular e, ainda, na quimiotaxia (Jiang *et al.*, 2019; Wang *et al.*, 2019). Assim sendo, o AI-2 é, também, um produto secundário deste ciclo – Figura 3. Consequentemente, apesar de a sua função enquanto molécula sinalizadora estar bem descrita em algumas espécies, é possível que na maioria seja apenas um *by-product*. Isto explicaria a razão pela qual a LuxS pode ser encontrada num elevado número de bactérias que não apresentam os recetores para o AI-2. No entanto, é possível que, mesmo nestas bactérias, o AI-2 forneça informação a outras bactérias que se encontram no mesmo ambiente (Antunes *et al.*, 2010; Pereira *et al.*, 2013).



**Figura 3 – Ciclo Metil Ativado.** O SAM funciona como dador do grupo metil, ao ceder este grupo forma SRH. Sendo que este é tóxico, a MTA/SAH nucleosidase converte-o em SRH que é, seguidamente, clivada em homocisteína e DPD por ação da LuxS. Para finalizar a homocisteína dá origem à metionina, que por sua vez, dá origem ao SAM, fechando, assim o ciclo. (Figura adaptada de Teren *et al.*, 2019).

### 3.2. Interação AI-2 – Célula

Em resposta ao aumento da densidade populacional, o AI-2 é secretado para o meio extracelular. Uma vez que estas moléculas têm baixa afinidade para lípidos, é pouco provável que consigam passar livremente a membrana celular (Pereira *et al.*, 2013).

Na *E. coli*, a proteína YdgG foi proposta como transportador. No entanto, um estudo com uma estirpe mutante sem o gene *YdgG* e a estirpe selvagem de *E. coli*, demonstrou que a diminuição da concentração de AI-2 no meio extracelular, na estirpe mutante, não foi significativa. Concluindo, assim, que a proteína contribuiu para a secreção, mas este não será o mecanismo principal, sendo que ainda não é claro qual será. Recentemente, a YdgG foi renomeado para TqsA – transporte do sinal de *Quorum Sensing*, do inglês *transport of quorum-sensing signal* (Pereira *et al.*, 2013; Rezzonico *et al.*, 2012).

Quando no meio extracelular, o AI-2 integre com recetores, que irão desencadear um conjunto de ações, culminando na alteração de expressão de alguns genes. Dado que diferentes espécies respondem a diferentes compostos da família AI-2, não é surpreendente que apresentem diferentes recetores (Galloway *et al.*, 2011). Porém, apenas duas proteínas foram bem caracterizadas: a LuxP e a LsrB, proteína B regulada pela LuxS. O recetor LuxP é uma proteína periplasmática característica da *Vibrios* spp. e reconhece o S-THMF-borato. Enquanto que, o LsrB interage com o R-THMF na *E. coli* e na *S. typhimurium* (Defoirdt, 2018; Pereira *et al.*, 2013). Algumas bactérias apresentam dois recetores distintos para o AI-2. Por exemplo, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* dispõem do LsrB e do RbsB. O RbsB é um outro recetor, que foi, também, identificado na *Haemophilus influenzae*. No entanto, não é conhecida a sua estrutura nem a isoforma do AI-2 com que interage (Zhao *et al.*, 2018).

Contudo, é muito provável que existam ainda outros recetores. Uma vez que, existem alguns organismos que respondem ao AI-2 e não apresentam nenhum dos recetores já identificados. A dificuldade de identificação de novos recetores não é surpreendente, uma vez que os conhecidos diferem bastante entre si, incluindo nos locais de ligação (Pereira, et al., 2013; Rui et al., 2012).

### 3.2.1. Transdução do Sinal com o Recetor LsrB

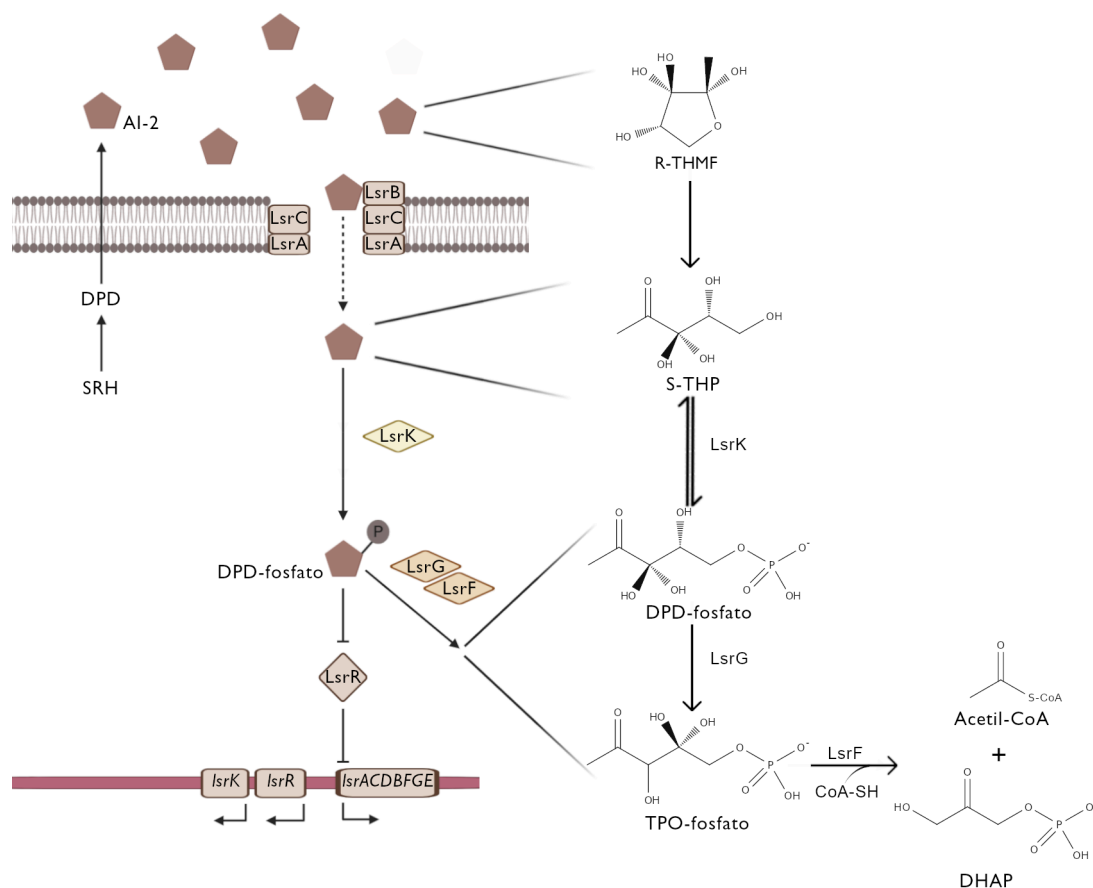
O recetor LsrB faz parte do sistema de transporte codificado pelo operão regulado pela LuxS – operão *lsr*. O sistema de transporte é composto pela LsrB, uma proteína periplasmática com elevada afinidade para o R-THMF, pela LsrC e LsrD, que formam um canal através da membrana, permitindo a passagem das moléculas, e pela LsrA, uma ATPase que fornece a energia necessária para o transporte (Pereira et al., 2013).

Na *E. coli* e na *S. typhimurium*, quando a concentração de AI-2 atinge o limiar, a cascata de transdução do sinal para internalização e processamento do AI-2 é ativada. O sistema de transporte Lsr é sintetizado e transportado para a membrana, começando a importar moléculas sinalizadoras. No citoplasma, o DPD é fosforilado pela cinase LsrK, dando origem ao DPD-fosfato. Este ativa o circuito QS através da ligação ao repressor, LsrR, libertando-o. Em situação de baixa densidade populacional e, conseqüente, inexistência de DPD-fosfato, o LsrR encontra-se ligado ao operão *lsr*, impedindo a sua expressão. Assim, quando o DPD-fosfato se liga ao LsrR dá-se um *feedback* positivo que aumenta a expressão do transportador na superfície celular e a maior internalização das moléculas de sinalização – Figura 4 (Roy et al., 2013; Zhu e Li, 2012).

Com o aumento da síntese das proteínas Lsr indicadas, há, também, aumento das proteínas LsrF e LsrG, responsáveis pela degradação do AI-2. O DPD-fosfato é transformado em TPO-fosfato (3,4,4-trihidroxi-2-pentanona-5-fosfato) pela LsrG. Após hidratação deste, a LsrF transfere o grupo acetil para a co-enzima A, dando origem ao DHAP (dihidroxi-acetonafosfato) e acetil-CoA, finalizando, assim, o ciclo do AI-2 (Stotani et al., 2019).

Para que haja a ativação inicial que leva à síntese do transportador Lsr, é necessário que haja internalização do AI-2 para desencadear esta ação. Na *E. coli*, pensa-se que as primeiras moléculas sinalizadoras sejam transportadas por um sistema de transporte diferente, o sistema fosfotransferase do fosfoenolpiruvato (PTS, do inglês *phosphoenolpyruvate phosphotransferase system*) (Rezzonico et al., 2012).





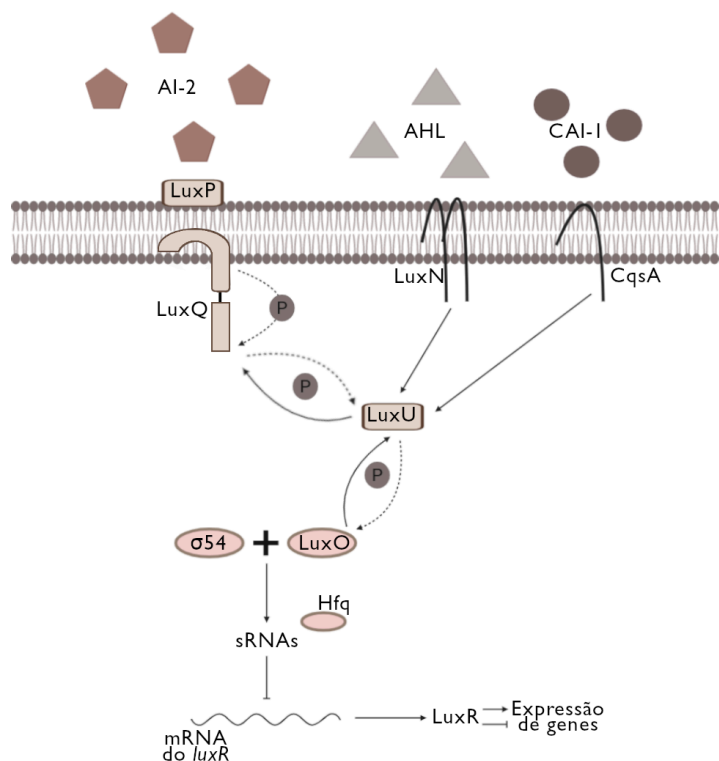
**Figura 4 – Sistema de QS dependente de AI-2 na *E. Coli* e na *S. typhimurium*.** À esquerda encontra-se esquematizada a via de sinalização do AI-2 nas duas bactérias indicadas. À direita está representada a degradação do DPD-fosfato. (Figura adaptada de Roy *et al.* 2011; Stotani *et al.*, 2019).

### 3.2.2. Transdução do Sinal com o Recetor LuxP

A LuxP tem elevada afinidade para o S-THMF-borato e está sempre associado a uma proteína da membrana plasmática, a LuxQ. Quando o LuxP se liga ao AI-2, o complexo interage com a LuxQ, que transporta a mensagem para o interior da célula (Pereira *et al.*, 2013; Zhu e Li, 2012).

Como referido anteriormente, a *V. harveyi* integra um sistema de QS paralelo, com os AIs AHL, CAI-1 e AI-2, que são reconhecidos pelos recetores LuxN, CqsS e LuxPQ, respetivamente. Quando em baixa densidade celular, ou seja, na ausência de AI-2, a LuxQ funciona como uma cinase, promovendo a fosforilação do LuxO, a proteína reguladora de luminescência. O LuxO-fosfato desencadeia a síntese de sRNAs (pequenos RNAs bacterianos) que destabilizam a transcrição do regulador LuxR, reprimindo, assim, a expressão do operão *lux* (Pereira *et al.*, 2013; Rezzonico *et al.*, 2012; Roy *et al.*, 2011; Zhu e Li, 2012). Quando em elevada densidade populacional, a função dos recetores é alterada, passando, estes, a atuar como fosfatases. Ou seja, o S-THMF-borato liga-se à LuxP que interage com a LuxQ. Nestas condições, a LuxQ desencadeia, em conjunto com os outros

recetores, a desfosforilação do LuxO. Assim, o mRNA da *luxR* não é degradado e a síntese do regulador LuxR aumenta. Este regulador LuxR ativa a transcrição do operão *luxCDABEGH*, que vai desencadear o processo de bioluminescência (Rezzonico *et al.*, 2012; Roy *et al.*, 2011; Teren *et al.*, 2019; Zhu e Li, 2012).



**Figura 5 – Sistema de QS dependente de AI-2 na *V. harveyi*.** Em condições de baixa densidade populacional, o LuxQ, o LuxN e o CqsA levam à fosforilação do LuxU e, conseqüentemente do LuxO. O LuxO-fosfato, juntamente com fator  $\sigma 54$ , dá origem a sRNAs. Estes complexam com a chaperona Hfq e destabilizam o mRNA derivado ao *luxR*. Impedindo, assim, a formação de bioluminescência. Em elevada densidade populacional, os recetores levam à desfosforilação do LuxO, permitindo a síntese do do regulador LuxR e conseqüente aparecimento de bioluminescência. (Figura adaptada de Roy *et al.*, 2011).

A *V. cholerae* integra, também, um sistema paralelo, com o AI-2 e CAI-1. No entanto, o aumento da concentração de AI leva a diminuição das atividades celulares controladas por QS. A *V. cholerae* apresenta, então, um sistema contra-intuitivo. Assim, em situações de baixa densidade populacional, tal como acontece na *V. harveyi*, os recetores funcionam como cinases e o mRNA do regulador HapR é desestabilizado. No entanto, contrariamente ao que acontece para o LuxR, a ausência do regulador HapR permite a expressão de genes que codificam fatores de virulência e formação de biofilme. Quando a densidade celular atinge o limiar, os recetores passam a comportar-se como fosfatases, o LuxO é desativado e o HapR é expresso. Os genes por este regulados são reprimidos (Roy *et al.*, 2011).

Vários estudos demonstraram que diferentes quantidades e combinações de Als desencadeiam diferentes respostas fenotípicas. Tal deve-se ao facto, de os recetores terem diferentes afinidades para os Als e diferente impacto da forças de sinal no LuxR. Pensa-se que as bactérias com mais do que um sistema de QS consigam distinguir entre mono e policulturas, com base nas diferentes combinações de Als (Pereira *et al.*, 2013; Rezzonico *et al.*, 2012).

### 3.3. Impacto do AI-2 nos Fenótipos Bacterianos

O sistema LuxS/AI-2 tem impacto na patogenicidade de vários organismos por regulação de determinados comportamentos destes. Por exemplo, na *V. cholerae* e na *V. harveyi*, está envolvido na regulação da bioluminescência. Está, também, relacionado com a formação de biofilme na *Streptococcus gordonii*, na *Streptococcus mutans*, na *Salmonella enterica*, na *A. actinomycetemcomitans*, na *V. cholerae*, na *Helicobacter pylori* e na *Klebsiella pneumoniae*, e com o síntese de fatores de virulência na *S. pneumoniae*, na *E. coli* 0157:H7 (EHEC) e na *Serratia marcescens* ATCC 274. Este sistema tem, também, uma relação direta com a motilidade na *Campylobacter jejuni* e na *H. pylori* e com a suscetibilidade a antibióticos na *Streptococcus anginosus*, na *Streptococcus suis* e na *E. coli* (Cao *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2019).

Os biofilmes são comunidades de microrganismos aderidas a superfícies, presentes em 65% a 80% das infeções bacterianas, sendo uma questão que preocupa os departamentos de saúde a nível mundial. A inserção das bactérias nestas comunidades protege-as de fatores externos como a resposta do sistema imunitário ou agentes antibacterianos, aumentando a probabilidade de re-infeção ou do desenvolvimento de doenças crónicas (Bao *et al.*, 2015; Ma *et al.*, 2018; Rabin *et al.*, 2015; Silva *et al.*, 2015).

Bactérias que crescem em biofilmes são 1000x mais tolerantes a antibióticos do que as bactérias planctónicas (Ma *et al.*, 2018). Por exemplo, na *Helicobacter pylori*, a presença de biofilme diminui a sua suscetibilidade a antibióticos e o aparecimento de resistência é mais frequente (Wang *et al.*, 2019). A relação do AI-2 com a produção de biofilme já foi estabelecida em bactérias como a *E. coli*, a *P. aeruginosa*, a *S. enterica*, entre outras (Chen *et al.*, 2020). Especificamente, na *S. suis*, a capacidade de produção de biofilme aumenta com a adição de AI-2 ao meio, sendo que a remoção do gene *luxS* tem ação contrária (Wang *et al.*, 2019). Outro fator que contribui para a resistência bacteriana é a sobre-expressão de bombas de efluxo, que permitem às bactérias eliminar ativamente antibióticos do meio intracelular para o meio extracelular. Já foi demonstrado que os sistemas de regulação de QS aumentam a ocorrência de bombas de efluxo na *E. coli*. Mais recentemente, foi observado que o AI-2 influencia a expressão das bombas na *S. suis*, levando a um aumento de

resistência às quinolonas. Já os mutantes em *luxS* demonstraram ser mais sensíveis a este grupo terapêutico. O sistema QS dependente de AI-2 está envolvido na regulação de muitos outros processos que contribuem para emergência resistência a antibióticos. Assim, a inibição deste sistema pode estar na base de uma nova abordagem para aumentar a suscetibilidade das bactérias (Wang *et al.*, 2019; Zhao *et al.*, 2020).

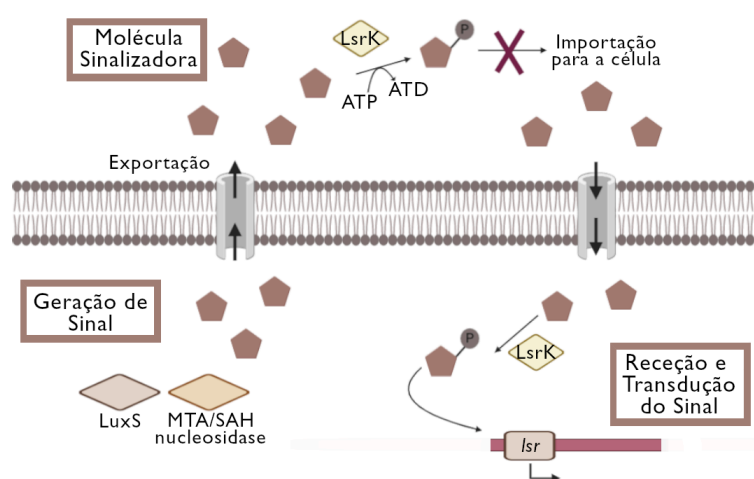
O AI-2 é responsável por alguns sistemas de comunicação inter-espécies bacterianas no nosso organismo em vários registos: entre bactérias da microflora natural, como acontece na cavidade oral, entre bactérias da microflora e bactérias patogénicas, como a *P. aeruginosa*, e, ainda, entre bactérias patogénicas (Roy *et al.*, 2011). A *P. aeruginosa* é uma bactéria oportunista presente na água e em ambientes húmidos. Em locais como feridas, devido à acumulação de moléculas sinalizadoras, pode tornar-se patogénica. Apesar de o sistema de QS principal ser dependente de AHL, a bactéria tem a capacidade de reconhecer o AI-2 sintetizado por bactérias da flora normal que se acumula no meio extracelular. Este AI aumenta a expressão de genes de fatores de virulência essenciais ao desenvolvimento da doença infecciosa, que muitas vezes pode ser crónica (Bzdrenka *et al.*, 2017; Roy *et al.*, 2011). No entanto, as bactérias patogénicas também podem aumentar a patogenicidade de outras bactérias patogénicas em infeções polibacterianas, como acontece na otite média (OM). A OM é uma doença infecciosa comum em crianças que pode ser recorrente ou crónica, devido à formação de biofilme. A *H. influenzae* e a *Moraxella catarrhalis* são duas bactérias identificadas em casos de OM crónica e foi provado que a *H. influenzae* promove a persistência da *M. catarrhalis* no biofilme recorrendo ao AI-2, sendo que é provável que este tipo de relação ocorra em outras infeções polibacterianas (Roy *et al.*, 2011).

A comunicação entre diferentes reinos também pode ser mediada pelo AI-2. Esta molécula sinalizadora permite a comunicação entre Protista-Fungi e Protista-Animalia. Na cavidade oral, a *S. gordonii* sintetiza AI-2, que é reconhecido pela *Candida albicans*, induzindo alterações fisiológicas. Já a *A. actinomycetemcomitans* consegue inibir a produção de biofilme pela *C. Albicans*, provavelmente através do AI-2 (Zhao *et al.*, 2018). Adicionalmente, o epitélio dos mamíferos produz uma molécula que imita o AI-2. A síntese desta é estimulada pelas bactérias e reconhecida pelos recetores de AI-2. Com isto, levantam-se duas hipóteses, ou o hospedeiro consegue controlar o comportamento da população bacteriana ou as bactérias conseguem forçar o hospedeiro a induzir fenótipos, potencialmente patogénicos, regulados pelo AI-2 (Defoirdt, 2018; Zhao *et al.*, 2018).

#### 4. Inibidores do Sistema QS-AI-2

Como o aumento da resistência a antibióticos é imperativo o desenvolvimento de novas estratégias para o controle de doenças infecciosas bacterianas. Um dos focos têm sido o desenvolvimento de terapias antivirulência, em que o alvo são os mecanismos de virulência e não os mecanismos essenciais ao crescimento bacteriano. É expectável que estas reduzam a patogenicidade das bactérias sem aplicar elevada pressão seletiva sobre as bactérias, sendo, assim, menos provável o desenvolvimento de resistência. Algumas das estratégias desta nova terapia baseiam-se na diminuição da produção de biofilme e de fatores de virulência regulados pelo QS, alcançado por inibidores de QS (Badawy *et al.*, 2020; Mellini *et al.*, 2019).

As estratégias de inibição de QS baseiam-se na competição com as moléculas nativas através da síntese de análogos das moléculas sinalizadoras, da limitação da geração de sinal e da destruição das moléculas sinalizadoras. A classificação das estratégias é feita com base no local de atuação, que podem ser os seguintes: na molécula sinalizadora, no gerador de sinal ou no recetor e transdutor do sinal – Figura 6 (Mina e Chbib, 2019; Roy *et al.*, 2011). Grande parte do trabalho feito neste campo tem sido direcionado para a inibição de sistemas dependentes de AHL, sendo assim específicos para um número limitado de espécies. No entanto, direcionar o foco para o AI-2 permite o desenvolvimento de estratégias de espectro de ação alargado que podem atuar sobre um maior número de espécies em simultâneo (Galloway *et al.*, 2011; Roy *et al.*, 2011).



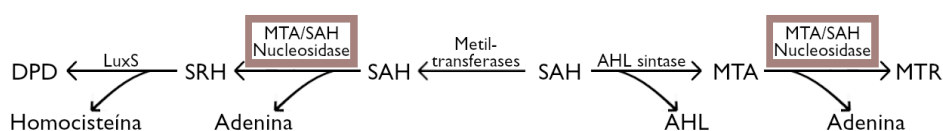
**Figura 6 – Três locais de inibição do sistema QS dependente de AI-2 na *E. coli*.** Inibição das enzimas geradoras de sinal: MTA/SAH nucleosidase e LuxS; Degradação da molécula sinalizadora no meio extra-celular; Bloqueio de recetores e da transdução do sinal. (Figura adaptada de Roy *et al.*, 2011).

#### 4.1. Inibição da MTA/SAH nucleosidase

A MTA/SAH nucleosidase foi identificada em bactérias, mas não em humanos, está relacionada com a síntese de AHL e AI-2 e, aparentemente, está envolvida na capacidade de produção de biofilme em alguns patogênicos. Todos estes fatores fazem desta enzima um alvo interessante para terapia antivirulência (Bao *et al.*, 2013; Fleitas Martínez *et al.*, 2018).

A estrutura da MTA/SAH nucleosidase já foi definida em várias espécies, incluindo a *E. coli*, a *H. pylori*, a *S. aureus*, a *S. pneumoniae*, a *V. cholerae*, a *S. enterica*, a *Brucella melitensis* e, mais recentemente a *Aeromonas hydrophila*. A enzima é um homodímero com dois centros ativos, cada um como locais específicos para a ligação da purina, da ribose e do grupo 5'-alquiltio (Fleitas Martínez *et al.*, 2018).

A síntese das duas famílias de auto-indutores AHL e AI-2 derivam do SAM e dependem da atividade da MTA/SAH nucleosidase – Figura 7. Enquanto que na síntese do AHL, o MTA surge com um produto secundário da ação da AHL sintase sobre o SAM, na síntese de AI-2 o SAH é precursor das moléculas sinalizadoras. Ambos, MTA e SAH, são tóxicos para a célula. Assim, a MTA/SAH nucleosidase previne o aumento da concentração destes, catalisando a saída da adenina do MTA e do SAH formando, respetivamente, MTR (5'-metiltioribose) e SRH. Assim, é expectável que a inibição da MTA/SAH nucleosidase leve à acumulação de MTA, inibindo a AHL sintase e, conseqüente, a síntese de AHL e que bloqueie diretamente a síntese de AI-2 (Gutierrez *et al.*, 2009; Roy *et al.*, 2011). Temos evidências que quando é retirado o gene *pfs* à estirpe *V. harveyi* BBI70, em que a luminescência dependente exclusivamente de AI-2, a síntese do AI encontra-se inibida, uma vez que a luminescência se encontra diminuída. (Schramm, 2018). O que apoia a hipótese descrita anteriormente.



**Figura 7 – Papel da MTA/SAH nucleosidase na síntese dos auto-indutores AHL e AI-2.** (Figura adaptada de Gutierrez *et al.*, 2009).

A MTA/SAH nucleosidase é essencial a vários sistemas de QS, mas tem, também, outras funções igualmente importantes para as células, como é o caso da sua função no AMC – Figura 3 (Fleitas Martínez *et al.*, 2018). Tal como nas bactérias, o SAM é um importante dador do grupo metil nos mamíferos e, em ambos os casos, forma-se MTA que tem de ser reciclado. Nos mamíferos esta reação é catalisada pela enzima MTA fosforilase, que embora tenha o mesmo substrato que a MTA/SAH nucleosidase, apresenta diferenças

estruturais que permitem o desenvolvimento de inibidores seletivos para a enzima bacteriana (Fleitas Martínez *et al.*, 2018; Parveen e Cornell, 2012). A MTA/SAH nucleosidase tem um local de ligação no centro ativo para o grupo 5'-alquiltio maior que a MTA fosforilase e o local de reconhecimento do grupo 2'-hidroxil está carregado negativamente enquanto que na MTA fosforilase está carregado positivamente (Parveen e Cornell, 2012).

A MTA/SAH nucleosidase está envolvida na regulação de vários processos através de sistemas de QS dependentes de AI-2, no entanto, há evidências de que pode estar, também, envolvido em vias de regulação de QS independentes de AI-2. Em dois estudos foi observado que a *S. aureus* NCTC 8325 sem o gene *pfs* apresentou virulência atenuada, menor proliferação e atividade das proteases a nível extracelular e menor produção de biofilme. Enquanto que *S. aureus* NCTC 8325 sem o gene *luxS* apresentou o mesmo nível de virulência que a estirpe selvagem, apoiando a hipótese apresentada. Assim a inibição da MTA/SAH nucleosidase permitirá a inibição dos dois tipos de vias de regulação (Bao *et al.*, 2013, 2015).

No entanto, a inibição da MTA/SAH nucleosidase leva a acumulação de MTA e SAH, o que é letal para a célula uma vez que elevadas concentrações destas inibem processos de crescimento e de síntese de DNA (Roy *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2019). Foram reportados mutantes em MTA/SAH nucleosidase de *V. cholerae* com crescimento comprometido (Silva *et al.*, 2015). No entanto, já foi demonstrado experimentalmente que é possível inibir a ação da MTA/SAH nucleosidase sem afetar de forma grave o crescimento das bactérias e sem induzir resistência aos inibidores (Fleitas Martínez *et al.*, 2018).

A maioria dos inibidores da MTA/SAH nucleosidase são análogos de estados de transição. Inicialmente, foi demonstrado que as pirrolidinas hidroxiladas são inibidores desta enzima, tendo sido proposto que seriam análogos de estados de transição (Roy *et al.*, 2011). No entanto, hoje em dia o foco encontra-se nas Imucilinas.

As Imucilinas são largamente utilizadas como antivirais, antimaláricos e antineoplásicos. Sendo que, algumas já se encontram na fase de estudos clínicos e outras foram aprovados para uso humano. Adicionalmente, são estáveis, específicas e passíveis de modificações químicas para aumentar a sua biodisponibilidade sem afetar a ação inibitória sobre a MTA/SAH nucleosidase (Evans *et al.*, 2018; Longshaw *et al.*, 2010). À Imucilina-A (Imm-A) e à DADMe-Imucilina-A (DADMe-Imm-A) foram adicionados diversos grupos químicos (aromáticos, cíclicos, hidrofóbicos, alifáticos halogenados, etc), na posição 5'-tio. Algumas das moléculas resultantes conseguem inibir a MTA/SAH nucleosidase sem afetar o crescimento da bactéria (Fleitas Martínez *et al.*, 2018; Zhu e Li, 2012).

Os análogos 5'-tio-Imm-A imitam estados de transição menos avançados em que a ligação entre a adenina e o ribosil está parcialmente quebrada. Os compostos 5'-etiltio-Imm-A, 5'-feniltio-Imm-A e p-metilfeniltio-Imm-A demonstraram atividade inibitória perante a MTA/SAH nucleosidase da *S. pneumoniae* – Anexo I secção A (Zhu e Li, 2012).

Os análogos 5'-tio-DADMe-Imm-A imitam estados de transição mais avançados em que o catião ribosil se encontra totalmente dissociado da adenina, sendo estes inibidores mais potentes que os anteriores (Fleitas Martínez *et al.*, 2018; Zhu e Li, 2012). Na *V. cholerae* NI6961, as moléculas 5'-metiltio-DADMe-Imm-A, 5'-etiltio-DADMe-Imm-A e 5'-butiltio-DADMe-Imm-A – Anexo I, secção B – inibem a síntese de AI-2 de forma dose-dependente sem afetar a taxa de crescimento das células. A 5'-metiltio e a 5'-butiltio-DADMe-Imm-A inibem, também, a síntese de AI-2 na *E. coli* O157:H7 (Fleitas Martínez *et al.*, 2018; Roy *et al.*, 2011). Adicionalmente, foi possível manter a inibição pela 5'-butiltio-DADMe-Imm-A em elevadas concentrações durante 26 gerações nas duas espécies com diminuição da produção de biofilme em 71% na *V. cholerae* e 18% na *E. coli*. Tal sugere que as bactérias não desenvolveram resistência (Schramm, 2018). Recentemente, foi demonstrado que a *V. cholerae* NI6961 consegue produzir biofilme quando exposta à 5'-metiltio-DADMe-Imm-A, no entanto, foi constatada elevada percentagem de inibição da enzima MTA/SAH nucleosidase. Duas estirpes mutantes em *pfs* apresentam mobilidade, quimiotaxia e taxa de crescimento diminuída, possivelmente devido à acumulação de SAH. Assim, os autores especulam, se a enzima tiver efeito sobre produção de biofilme, seja devido à diminuição de motilidade e quimiotaxia e não devido à inibição do QS (Silva *et al.*, 2015).

Outros análogos com base na 5'-tio-DADMe-Imm-A foram sintetizados especificamente para a *S. enterica*. A MTA/SAH nucleosidase desta bactéria tem um local de ligação para o grupo 5'-alquiltio maior, assim, foram de desenhados inibidores como o grupo 5'-alquiltio alongado: 2-hidroxi-etiltio-DADMe-Imm-A, 3-hidroxi-propiltio-DADMe-Imm-A, 4-hidroxi-butiltio-DADMe-Imm-A e 2-(2-hidroxi-etoxi)etiltio-DADMe-Imm-A – Anexo I, secção C (Fleitas Martínez *et al.*, 2018).

Foram também testados compostos derivados de purinas e indazol. Ainda que alguns sejam bons inibidores, conduzem a um diminuição da taxa de crescimento, aumentado, assim, o um risco de desenvolvimento de resistência (Roy *et al.*, 2011).

## 4.2. Inibição da LuxS

A LuxS é um potencial alvo para o desenvolvimento de novas terapêuticas, uma vez que está presente num elevado número de bactérias e ainda não foi descrita na *Archaea* nem na *Eukarya* (Rezzonico *et al.*, 2012). Além disso, a enzima controla processos como a

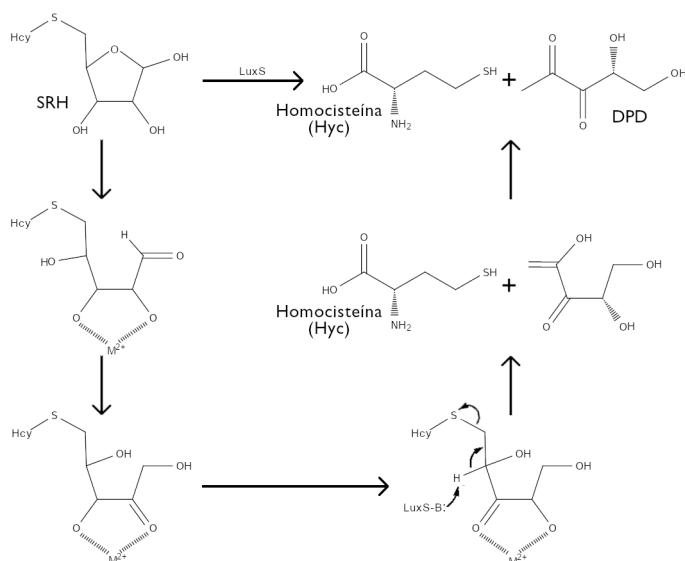


formação de biofilme e a síntese de fatores de virulência através da síntese do AI-2. Contudo, pensa-se que poderá, também, regular a formação de biofilme por vias independentes do AI-2, como por regulação direta da expressão de genes associados ao biofilme. Já foi demonstrado *in vivo* que a inibição da via LuxS diminui a virulência de alguns organismos patogênicos (Fleitas Martínez *et al.*, 2018).

Uma vez que a LuxS catalisa processos essenciais à sobrevivência das bactérias, a sua inibição não irá exercer pressão seletiva elevada sobre estas (Wang *et al.*, 2019). No entanto, a inibição pode levar à acumulação de produtos tóxicos e, isso sim, levar a desvantagem competitiva que favoreça o aparecimento de resistência (Fleitas Martínez *et al.*, 2018).

A LuxS é uma metaloenzima homodimérica com dois locais ativos idênticos, cada um com um ião metálico que atua como cofator. Inicialmente, foi proposto que o ião seria o zinco ( $Zn^{2+}$ ), no entanto, foi demonstrado que a atividade enzimática é superior com o ferro bivalente, sendo este o aceita atualmente. O ião encontra-se coordenado com 3 resíduos (na *Bacillus subtilis* são His-54, His-58, e Cys-126) e uma molécula de água (Pereira *et al.*, 2013; Zhu e Li, 2012).

O mecanismo de ação de LuxS baseia-se em três passos *major*: duas isomerizações seguidas de uma  $\beta$ -eliminação. Primeiramente, ocorre a abertura do anel do SRH formando um aldeído. O ião metálico da LuxS atua como um ácido de Lewis e catalisa a saída do hidrogénio do carbono-C2, dando-se a isomerização aldeído-cetona com formação de C2-cetona. O passo repete-se, sendo que a saída do hidrogénio dá-se no carbono-C3 e o grupo cetona é transferido para este, formando-se a cetona-C3. De seguida, a LuxS, comportando-se como uma base e catalisa a saída do H do carbono-C4, dando-se a  $\beta$ -eliminação da homocisteína e formação de um enol que sofre um rearranjo espontâneo e dá origem à molécula DPD (Fleitas Martínez *et al.*, 2018; Galloway *et al.*, 2011).



**Figura 8 – Mecanismo de ação da LuxS.** (Adaptada de Galloway *et al.*, 2011).

#### 4.2.1. Inibidores Análogos do SRH

A maioria das estratégias de inibição da enzima LuxS recorrem a análogos do SRH, que iram competir com este e interferir com determinados passos da reação (Fleitas Martínez *et al.*, 2018). Vários estudos demonstram que esta classe de inibidores é a que apresenta melhores resultados, sugerindo que a porção  $-CNH_2COOH$  do ribosil-homocisteína é essencial para estabelecer ligação com a enzima (Zhu e Li, 2012).

Ao retirar o grupo hidroxilo do carbono-C1 da ribose, obtêm-se análogos que impedem a abertura do anel e, conseqüentemente, a isomerização aldeído-cetona – Anexo II, secção A – como é o caso da S-anidroribosyl-L-homocisteína. O grupo 2,3-diol foi mantido para poder estabelecer ligação com o íão metálico da LuxS e, assim, interagir de forma semelhante ao SRH (Galloway *et al.*, 2011; Mina e Chbib, 2019). Por substituição do oxigénio da ribose por um azoto, foi sintetizado o S-(1-amino-1,4,-anidro-1,5-didesóxi-D-ribitol-5-il)-L-homocisteína que exhibe inibição concentração-dependente da LuxS (Malladi *et al.*, 2011). Um outra molécula que possivelmente, também, inibe a abertura do anel é a S-(1,5-didesóxi-4-tio-D-ribofuranos-5-il)-L-homocisteína, em que o oxigénio foi substituído pelo enxofre (Sobczak *et al.*, 2015).

É, também, possível inibir a isomerização cetona-cetona com análogos do SRH aos quais foram retirado ou alterado o grupo hidroxil do carbono-C3 da ribose – Anexo II, secção B. Um grupo sintetizou um conjunto de compostos e avaliou a atividade de cada um na LuxS da *B. subtilis*. O S-(3,5-didesóxi-D-eritropentofuranos-5-il)-homocisteína e o S-(5-desóxi-3-O-metil-D-xilofuranos-5-il)-homocisteína, que resultaram da remoção e da metilação do grupo hidroxil, respetivamente, apresentaram atividade inibitória. Assim como, o S-(3,5-didesóxi-3-flúor-D-xilofuranos-5-il)-homocisteína, com flúor no carbono-C3. No entanto, o inibidor mais potente foi obtido por inversão da estereocentro no carbono-C3, o S-(5-desóxi-D-xilofuranos-5-il)-homocisteína (SXH). Por fim, os análogos de SRH halogenados no carbono-C3, com bromo e flúor, demonstraram inibição dependente de tempo: S-(3-bromo-3,5-didesóxi-D-ribofuranos-5-il)-L-homocisteína e S-(3-flúor-3,5-didesóxi-D-ribofuranos-5-il)-L-homocisteína (Galloway *et al.*, 2011).

Foram sintetizados análogos do intermediário 2-cetona – anexo II, secção C – o Ácido (2S)-2-amino-4-[(2R,3S)-2,3-dihidroxi-3-N-hidroxi-carbamil-propiltio]-butírico e o Ácido (2S)-2-amino-4-[(2R,3R)-2,3-dihidroxi-3-N-hidroxi-carbamil-propiltio]-butírico, e observou-se que ambos atuavam como inibidores competitivos e reversíveis da LuxS. Porém, a produção de biofilme na *E. coli* K12, na *Listeria innocua* e na *Bacillus cereus* não diminuiu quando expostos aos compostos (Galloway *et al.*, 2011; Mina e Chbib, 2019). A estabilidade necessária destes isómeros é dada pelo grupo funcional  $RC(O)N(OH)R'$  que

interage com o íão metálico da enzima diminuindo o *turnover* catalítico (Galloway *et al.*, 2011). Juntamente com estes dois compostos foram testados outros em que a homocisteína foi alterada, como a  $\delta$ -ribosilornitina e a S-ribosilcisteína. No entanto, estes não apresentaram atividade inibitória, o que confirma a importância da homocisteína para a interação com LuxS (Mina e Chbib, 2019).

Por fim, é possível inibir a  $\beta$ -eliminação, o último passo do mecanismo de ação da LuxS – Anexo II, secção D. Por exemplo, com a substituição da ligação carbono-C5-enxofre do SRH por uma ligação carbono-C5-carbono C6-enxofre obtém-se o análogo S-homolibosil-L-cisteína ao qual é impossível quebrar a ligação carbono-enxofre, devido ao carbono extra. Este composto demonstra atividade inibitória dose-dependente (Galloway *et al.*, 2011; Mina e Chbib, 2019). Foram, também, desenhados e sintetizados compostos em que o carbono-C5 e o enxofre foram substituídos por grupos fluoro-vinil. Como é o caso do 3,5,6,-tridesóxi-6-flúor-D-eritro-hex-5-enofuranose que demonstrou atividade inibitória competitiva na LuxS do *B. subtilis* (Galloway *et al.*, 2011). Recentemente, foi feita uma outra abordagem: substituição do hidrogénio em carbono C-4 por grupos de cadeia aberta ou fechada no SRH, dando origem a, por exemplo, S-(5-desóxi-4-C-hexil-D-ribofuranosil-)-L-homocisteína. Potencialmente, o novo grupo adicionado irá bloquear a  $\beta$ -eliminação por não poder haver saída do hidrogénio. Os autores sugerem ainda que, devido ao tamanho e natureza do grupo adicionado, os compostos possam inibir a dimerização da enzima (Chbib *et al.*, 2016).

#### 4.2.2. Inibidores Não Análogos do Substrato

Há, também, inibidores da LuxS não análogos do SRH, como, por exemplo, o peptídeo TNRHNP HHLHHV (Wang *et al.*, 2019). No seguimento deste, foram descritos outros dois peptídeos, derivados da LuxS da *Edwardsiella tarda* TXI – Peptídeo 5411 (MHTLEHLFAGFM) e Peptídeo 5906 (MLFAGFM). Estes demonstraram ser potentes inibidores da enzima, atenuando a virulência da bactéria no peixe *Paralichthys olivaceus* infetado. Os peptídeos, expressos pela *P. aeruginosa* ou produzidos pelo tecido infetado do peixe, levam a redução da síntese de AI-2, a redução da produção de biofilme e a repressão de genes da estirpe TXI (Zhang *et al.*, 2009). Recentemente, foi demonstrado que o peptídeo 5906 expresso pela *E. coli* diminui, também, a patogenicidade da *E. tarda* TXI, assim como, da *V. harveyi* T4 e da *A. hydrophila* AHI. No entanto, a diminuição nestas duas bactérias é moderada quando comparada com a da *E. tarda*. Foi sugerido, que tal se devesse às diferenças na sequência da LuxS dos diferentes agentes patogénicos (Sun e Zhang, 2016).

Estas evidências levam a querer que os peptídeos poderão estar na base de novas terapias antivirulência.

O uso de moléculas inibidoras da enzima LuxS tem sido a estratégia mais estudada. Porém, interferir com a expressão do gene *luxS* é, também, uma abordagem interessante que permite debilitar a atividade da enzima e, conseqüentemente, a síntese de AI-2 (Fleitas Martínez *et al.*, 2018). Recorrendo à tecnologia *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats-Cas 9* (CRISPR-Cas9) foi possível obter uma estirpe de *E. coli* SE15 deficiente de *luxS*. Esta demonstrou menor produção de biofilme que *E. coli* SE15 selvagem, sem alteração da taxa de crescimento. Adicionalmente, alguns genes envolvidos na regulação da produção de biofilme (*mqsR*, *pgaB*, *pgaC*, *csgE* e *csgF*) encontravam-se reprimidos (Kang *et al.*, 2017). Da CRISPR-Cas9 surgiu uma variante, a CRISPR *interference* (CRISPRi). Nesta variante, a Cas9 não tem atividade catalítica, ou seja, não ocorre edição de genes. No entanto, o sistema continua a ter capacidade de ligação ao gene alvo e, após ligação, a CRISPRi consegue reprimir a expressão deste. Esta técnica foi aplicada à *E. coli* AK-117 e foram obtidas três estirpes diferentes com o gene *luxS* reprimido. Todas as estirpes se mantiveram metabolicamente ativas, mas com produção de biofilme diminuída (Zuberi *et al.*, 2017). Estes estudos demonstram que a aplicação de técnicas de manipulação genética ao *luxS* destabilizam mecanismos de patogenicidade, como a formação de biofilme.

### 4.3. Inibição do AI-2

Uma abordagem utilizada por alguns microrganismos para inibir o QS é inativar ou desnaturar o AI. Assim, este não conseguirá interagir com os recetores e desencadear fatores que contribuam para a patogenicidade da bactéria (Wang *et al.*, 2019).

Ao adicionar LsrK e ATP ao meio extracelular, o AI-2 é fosforilado e, devido à carga negativa adicional, não consegue interagir com o recetor, restringindo, assim, o seu transporte para o interior da célula. Foi feito um estudo em monoculturas de *E. coli*, *S. typhimurium* e *V. harveyi* e, também, em policultura com as três bactérias. Com a adição da LsrK, extraída da *E. coli*, e do ATP, a resposta ao QS é altamente reduzida em todas as culturas (Roy, Fernandes, *et al.*, 2010; Roy *et al.*, 2011). Tendo em conta que a LsrK atua no DPD, a estratégia não depende do mecanismo de reconhecimento e transdução do sinal de cada bactéria. Assim sendo, poderá ser particularmente eficaz em infecções polibacterianas (Fetzner, 2015).

Para que esta técnica possa ser aplicada na clínica, para o tratamento de infecções, a LsrK e o ATP poderão ser encapsulados. No entanto, o ATP decompõem-se em pH ácido e temperaturas elevadas, o que poderá limitar uso desta estratégia (Fetzner, 2015).

#### 4.4. Inibidores dos Recetores e da Transdução

Para além das enzimas de síntese e das moléculas sinalizadoras, existem outros potências alvos para estratégias de inibição de QS dependente de AI-2. Como é o caso dos recetores e dos reguladores genéticos.

##### 4.4.1. Inibidores Análogos do DPD

Como indicado anteriormente, o AI-2 não apresenta uma estrutura definida, o que se apresenta como um desafio para desenhar análogos deste (Roy *et al.*, 2011). Assim, o foco foi direccionado para o DPD, o precursor comum, tendo sido possível sintetizar compostos com capacidade de inibir recetores e a transdução de sinal. No entanto, esta tarefa encontrou-se dificultada pelo facto de o DPD ser instável em elevadas concentrações, originando a oligomerizações (Smith *et al.*, 2009).

Inicialmente, foram adicionados ao carbono-C1 do DPD diferentes grupos alquilo lineares e, também, os grupos azidobutilo e fenilo (Anexo III, compostos 1-4, 7 e 8). Todos os análogos obtidos demonstraram atividade antagonista na *S. typhimurium* Met844, avaliada pela atividade da  $\beta$ -galactosidase, sem afetar a taxa de crescimento. Sendo que, o propil-DPD e o butil-DPD foram os inibidores mais potentes, levando a maior redução da expressão do gene *lsr* (Roy *et al.*, 2011). Outro grupo, demonstrou que butil-DPD e pentil-DPD (Anexo III, composto 3 e 5) inibem a síntese do fator de virulência piocianina na *P. aeruginosa*, fenótipo regulado por QS, em aproximadamente 50% (Galloway *et al.*, 2011).

Contrariamente ao que acontece para *S. typhimurium* e *P. aeruginosa*, na *V. harveyi* MM32 todos os análogos C1-alquil inicialmente sintetizados (Anexo III, compostos 1-4, 7 e 8), demonstraram atividade agonista sinérgica, aumentando a bioluminescência induzida pelo DPD adicionado (Rui *et al.*, 2012). Foi observado que com o aumento da cadeia, a atividade sinérgica diminuía (Galloway *et al.*, 2011). Foram, também, sintetizados análogos ramificados, como o isopropil-DPD e o terc-butil-DPD, e cíclicos, como o ciclopropil-DPD e o ciclo-hexil-DPD (Anexo III, compostos 9, 13, 14 e 15), mas, apesar da diversidade em tamanho e forma, todos potenciaram a bioluminescência da *V. harveyi* (Smith *et al.*, 2009). As diferentes atividade dos análogos na *S. typhimurium* e na *V. harveyi* não são surpreendentes se tivermos em consideração as diferenças entre os recetores e, também, entre as moléculas sinalizadoras: na *V. harveyi* é boratada e não fosforilada e na *S. typhimurium* é fosforilada (Roy, Smith, *et al.*, 2010).

Num outro estudo, foi feita uma comparação direta entre os análogos alquil-DPD (Anexo III, compostos 1-4, 7 e 8) e *Fimbrilides*, uma classe de furanonas naturais que inibe fortemente o sistema de QS dependente de AI-2 (descritas na ponto 4.5.1). Todos os

análogos utilizados apresentaram atividade inibitória para a *V. harveyi* BBI70. E, de forma geral, o aumento da cadeia levou a aumento da atividade, sendo que o hexil-DPD foi o composto que demonstrou maior potência. Resultados semelhantes foram obtidos com a adição dos análogos do DPD à estirpe *V. harveyi* MM32, na presença de DPD (Lowery et al., 2009).

Um conjunto de análogos C1-álquil-DPD, lineares – etil- a heptil-DPD –, ramificados – isopropil-, isobutil-, 2,2-dimetilpropil-, 1-metilpropil- – e cíclicos – ciclopropil- – (Anexo III, compostos 1-6, 9-12 e 14), foram sintetizados e a sua atividade na *E. coli* foi avaliada. Nenhum afetou o crescimento celular e todos demonstraram ser antagonistas, excetuando o etil-DPD que tem atividade agonista e o ciclopropil-DPD que não demonstrou qualquer tipo de atividade. É de notar que, a adição de apenas um carbono conduz a uma mudança drástica da atividade da molécula: o etil-DPD comporta-se como agonista e o propil-DPD antagonista. Este grupo concluiu, também, que, possivelmente, os análogos depois de entrarem na célula são fosforilado pela LsrK e irão competir com o DPD-fosfato, para se ligarem ao LsrR. Assim, irão estabilizar ou destabilizar o complexo LsrR-DNA e, respetivamente, diminuir ou aumentar a expressão do operão *lsr*. Por fim, para determinar o comportamento em policulturas, os análogos foram adicionados a um ecossistema composto pela *E. coli* W3110, *V. harveyi* BBI70 e a *S. typhimurium* MET708. Foi possível demonstrar que alguns compostos são específicos para a espécie e outros não, o que abre portas para o desenvolvimento de terapêuticas antivirulência de espectro estreito e alargado (Roy, Smith, et al., 2010).

Outro grupo propôs o tratamento de biofilme da *E. coli* por aplicação conjunta do isobutil-DPD (Anexo III, composto 3) com um campo elétrico. Os resultados demonstraram que a associação diminuí drasticamente a produção de biofilmes, sendo mais eficaz que a monoterapia com isobutil-DPD. Pensa-se que o aumento em eficácia se deva a maior permeabilidade para o análogo promovida pela corrente elétrica. Assim, temos uma possível nova abordagem para a remoção de biofilmes de dispositivos médicos, como cateteres (Subramanian et al., 2016).

Recentemente, surgiu uma nova forma de inibição do QS dependente de AI-2: inibição da enzima LsrK. Como indicado anteriormente, esta enzima é necessária para a ativação do AI-2, em espécies como a *E. coli* ou a *S. typhimurium*. Assim, com a inibição da LsrK a molécula sinalizadora não conseguiria interagir com o LsrR. Neste estudo, foram sintetizados 29 compostos derivados do DPD. No entanto, apenas 4 compostos, derivados contendo pirazol di- e tri-substituídos (Anexo IV), demonstraram atividade inibitória para a LsrK. Sendo que inibição, *in vitro*, foi superior a 40% para os quatro (Stotani et al., 2019). Este

estudo poderá ter aberto portas para o desenvolvimento de uma nova classe de compostos antivirulentos.

#### 4.4.2. Inibidores do Recetor LuxP

O recetor LuxP tem cadeias laterais de Arg 215 e Arg 310 carregadas positivamente, que formam várias pontes de hidrogénio com três dos quatro oxigénios ligados ao boro do S-THMF-borato. Tem, também, as cadeias Trp 82 e Gln 77 que estabelecem três pontes de hidrogénio com dois grupos OH. E, por fim, a cadeia Ala 159 que faz uma ponte de hidrogénio com o anel (Zhu e Li, 2012).

Foi testada a atividade de vários derivados do ácido bórico na *V. harveyi* MM32. Estes compostos têm semelhanças estruturais com o S-THMF-borato, que facilitam a interação com o recetor LuxP. Assim, vários dos compostos inibiram significativamente a atividade sem afetar o crescimento bacteriano (alguns dos compostos encontram-se representados no Anexo V, secção A). Conclui-se, também, que os derivados *para* substituídos sem outros grupos ionizáveis apresentam os melhores resultados (Galloway *et al.*, 2011; Zhu e Li, 2012).

Um outro grupo testados foram os compostos diol aromáticos. Estes são conhecidos por formar complexos com ácido bórico e os produtos resultantes são semelhantes ao S-THMF-borato (Galloway *et al.*, 2011; Zhu e Li, 2012). Mais uma vez, alguns compostos demonstraram atividade inibitória para a *V. harveyi* sem afetar a taxa de crescimento. As cinco moléculas mais ativas foram o pirogalol e alguns derivados deste (Anexo V, secção B) (Galloway *et al.*, 2011). Um outro estudo, reavaliou a atividade inibitória do pirogalol e confirmou que a sua presença diminuí a bioluminescência na *V. harveyi*, em várias estirpes, sem afetar o crescimento. No entanto, não é o pirogalol que interfere com o sistema QS da bactéria, mas sim um produto resultante sua auto-oxidação, o peróxido de hidrogénio (Defoirdt *et al.*, 2013). Este estudo enfatiza a necessidade de usar métodos sensíveis e controlos adequados que confirmem a real interferência com os sistemas QS.

Com base na estrutura cristalina do LuxP, foi selecionado um outro conjunto de compostos para avaliar a sua ação na *V. harveyi* MM32. Dois compostos destacaram-se, KM-03009 e SPB-02229 (Anexo V, compostos 14 e 15), pela sua atividade inibitória do sistema QS dependente de AI-2, sem apresentar citotoxicidade. As suas estruturas sulfona, assemelha-se ao complexo borato do S-THMF-borato. Tem dois oxigénios com as características necessárias para interagir com a Arg 215 e Arg 310 do local de ligação da LuxP (Zhu e Li, 2012). Com base nestes resultados, outros compostos foram sintetizados (alguns dos compostos encontram-se representados no Anexo V, secção C) e conclui-se que, para a inibição, os compostos beneficiam do grupo sulfona, da substituição do oxigénio

do grupo carbonilo por enxofre, de um grupo hidrofóbico de tamanho considerável e de um sistema bi-fenil (Galloway *et al.*, 2011).

#### 4.5. Compostos Naturais

Para finalizar, são apresentados alguns compostos naturais e seus derivados que demonstraram ser inibidores de QS, especificamente de AI-2.

##### 4.5.1. Furanonas Halogenadas

As plantas e os fungos convivem com bactérias capazes de QS à muito tempo e algumas conseguiram desenvolver, naturalmente, inibidores de QS que atenuam a doença causada por estas (Roy *et al.*, 2011). Por exemplo, a *Delisea pulchra*, a alga marinha vermelha, sintetiza uma classe de furanonas halogenadas, as *Fimbrolides*, que inibem processos regulados por QS na *E. coli*, na *V. harveyi*, entre outras. Assim, uma grande diversidade de derivados naturais e sintéticos destas têm sido investigados (Rütschlin e Böttcher, 2020).

Uma das primeiras furanonas halogenadas a ser estudada foi a (5Z)-4-bromo-5-(di-bromometileno)-3-butil-2(5H)-furanona (Anexo VI, composto 1), produzida pela *D. pulchra*. Este composto tem a capacidade de inibir QS dependente de AHL, AI-2 e CAI-I na *V. harveyi* (Zhu e Li, 2012) e QS dependente de AI-2 na *E. coli*. Na *E. coli*, foram observadas alterações na expressão de vários genes, muitos deles envolvidos na quimiotaxia, na motilidade e na síntese de flagelos. Sendo que, 80% dos genes reprimidos são controlados pelo AI-2 (Roy *et al.*, 2011).

Pensa-se que as furanonas halogenadas tenham mais do que um alvo. Na *V. harveyi*, irão interagir com o LuxR, reduzindo a afinidade e estabilidade da ligação do regulador ao DNA. Assim, os três sistemas de QS serão inibidos (Bzdrenga *et al.*, 2017; Zhu e Li, 2012). No entanto, poderão, também, diminuir a síntese de AI-2, em bactérias como a *E. coli*, por alteração covalente da LuxS, inativando-a (Fleitas Martínez *et al.*, 2018). Este segundo alvo foi identificado num estudo realizado com um conjunto de furanonas naturais (Anexo VI, secção A). Neste, foi, também, proposto um mecanismo para a inibição (Anexo VI, secção B) em que um nucleófilo da LuxS é adicionado ao vinilbrometo, o do anel ou não, dando origem a intermediário. O brometo do intermediário é eliminado e a enzima LuxS alterada e inibida (Zhu e Li, 2012). Um conjunto de furanonas foi sintetizado (Anexo VI, secção C e D) e uma observação importante foi feita: o grupo brometo-vinil exocíclico é essencial para a inibição de formação de biofilme na *E. coli* (Galloway *et al.*, 2011).



Várias furanonas têm sido sintetizadas e testadas em variadas bactérias, como a *P. aeruginosa*, a *B. subtilis*, a *Staphylococcus epidermidis*, a *Phorphyromonas gingivalis*, a *S. enterica* serovar *Typhimurium*, a *Streptococcus spp.* e a *Vibrio spp.*, demonstrando atividade inibitória para a formação de biofilme (Brackman e Coenye, 2015). No entanto, algumas demonstraram ser tóxicas para as bactérias (Galloway *et al.*, 2011) ou, mesmo, para os hospedeiros, como o *Oncorhynchus mykiss* e os fibroblastos humanos. Assim sendo, há um esforço para a síntese de derivados de furanonas menos tóxicas e mais eficazes, que promovam a sua comercialização e uso terapêutico (Tang e Zhang, 2014).

#### **4.5.2. Ácidos Gordos**

Inicialmente, foi descoberto que alguns produtos alimentares eram capazes de inibir atividade dependente de AI-2. Mais tarde, observou-se que vários ácidos gordos de cadeia longa derivados de carne de aves de capoeira demonstraram ação inibitória na *V. harveyi* (Roy *et al.*, 2011) - Anexo VII. O ácido linoleico, o ácido oleico, o ácido palmítico e o ácido esteárico demonstraram inibição entre os 20 e os 90% sem afetar a taxa de crescimento das bactérias (Zhu e Li, 2012). Compostos semelhantes foram, também, identificados em extratos de carne de vaca picada (Galloway *et al.*, 2011).

#### **4.5.3. Aldeído cinâmico e derivados**

Aldeído cinâmico é um dos constituintes mais importantes da *Cinnamomum verum*. Este composto e os seus derivados, em baixas concentrações, inibem o AHL e o AI-2 na *V. harveyi*. Tal, leva a uma série de alterações fenotípicas, como redução da virulência e aumento da suscetibilidade ao stress (Galloway *et al.*, 2011; Tang e Zhang, 2014). Os compostos ligam-se ao LuxR, por uma reação de adição do tipo Michael, e alteram a sua conformação e reduzindo a sua capacidade de ligação ao DNA (Brackman e Coenye, 2015; Zhu e Li, 2012).

#### **4.5.4. Sumo de Toranja**

O sumo de toranja tem na sua composição uma classe de moléculas denominadas de furanocumarinas ou furocumarinas, no qual se inserem a bergamotina e a di-hidroxibergamitina (DHB) – Anexo IV. Estas inibem a atividade do AHL e AI-2 da *V. harveyi* (Kalia, 2013), e pensa-se que, em ambos os casos, será por competição com o AI para se ligarem ao recetor (Galloway *et al.*, 2011). A bergamotina e a DHB purificadas levam a uma inibição de 94,7% a 97,7% do AI-2 na *V. harveyi*. Já o sumo natural da toranja apenas inibe no intervalo de 16,8% a 27,5%, provavelmente, a menor inibição pelo sumo deve-se à menor

concentração das furanocumarinas. O sumo de toranja inibe, também, a formação de biofilme na *E. coli* O157:H7, na *Salmonella typhimurium* e na *P. aeruginosa* (Kalia, 2013).

## 5. Perspetivas Futuras

Embora os estudos sobre inibição de QS dependente de AI-2 tenham resultados promissores, ainda há alguns pontos que têm de ser investigados e obstáculos que têm de ser ultrapassados. Por exemplo, muitas moléculas demonstraram ter atividade inibitória em determinadas bactérias, no entanto, em algumas ainda não se conhece o mecanismo de ação ou, mesmo, o alvo em que atuam (Defoirdt, 2018). Já foi apresentado o caso específico que representa bem esta necessidade: o pirogalol, em que inicialmente aparentava ser inibidor na *V. harveyi*, mas, na realidade, esta ação era um efeito secundário da sua auto-oxidação (referido no ponto 4.4.2) (Defoirdt *et al.*, 2013).

De forma geral, a terapêutica de doenças infecciosas inicia-se após a infeção estar estabelecida, porém os estudos, na sua maioria, reportam abordagens preventivas. É expectável que os fenótipos regulados pelo QS sejam mais importantes no início da infeção do que em estados mais avançados, assim surgem as questões: Será que os resultados serão semelhantes quando os inibidores são adicionados após o início da infeção? Ou serão mais indicados para a prevenção de doenças na produção animal e vegetal? (Defoirdt, 2018).

Inicialmente, os inibidores de QS foram abordados como compostos aos quais as bactérias não iriam desenvolver resistência. Para esta surgir é necessário que uma determinada condição ou característica dê vantagem competitiva a outras bactérias, que não apresentem essa mesma condição ou característica. Com o alvo destes compostos inibitórios não são processos essenciais às bactérias, não é espectável que haja pressão seletiva. E estudos feitos em condições ideais de crescimento assim o indicam. Contudo, estas condições não retratam o que acontece *in vivo* em situação de infeção (Defoirdt *et al.*, 2010). O primeiro caso reportado de resistência a inibidores de QS foi na *P. aeruginosa*, em que a única fonte de carbono era a adenosina. Algumas bactérias mutaram e passaram a apresentar bombas de efluxo. Assim, o efluxo do composto inibidor aumentou e as estas bactérias encontravam-se em vantagem competitiva, surgindo resistência. Além disso, bactérias, nunca expostas ao inibidor, tratadas com antibióticos apresentavam estas mesmas bombas e eram, também, elas resistentes ao inibidor de QS (Kalia *et al.*, 2014). É necessário fazer estudos comparativos entre bactérias nativas e com mutações e, também, em diversos meios e modelos animais, de forma a prever a probabilidade de desenvolvimento de resistência (Defoirdt *et al.*, 2010; Garcia-Contreras *et al.*, 2016). No entanto, pensa-se que este desenvolvimento surja de forma mais lenta do que surgiu para os antibióticos

tradicionais. Para além disso, o uso combinado de ambos continua a ter algumas vantagens, como a diminuição do biofilme por parte do inibidor de QS e aumento da permeabilidade para os antibióticos (García-Contreras *et al.*, 2013).

Por fim, é necessário determinar métodos para direccionar e entregar os compostos, assim como, estudos de avaliação da toxicidade e de efeitos secundários (Grandclément *et al.*, 2015).

## 6. Conclusão

Com a descoberta da penicilina e, conseqüentemente, de outros antibióticos foi possível ter um controlo sobre doenças infecciosas nunca experienciado antes. No entanto, sendo estes bacteriostáticos ou bactericidas, rapidamente surgiram estirpes resistentes. Sendo que, hoje em dia, o número de bactérias multirresistentes continua em ascensão.

A inibição de sistema de QS depende de AI-2 surge como uma alternativa aos antibióticos. Ao bloquear o AI, a sua síntese ou receção, é possível interferir com a comunicação entre as bactérias e, assim, impedir que estas coordenem o seu comportamento. Adicionalmente, alguns fenótipos, que contribuem para a virulência das bactérias, são ativados por estes sistemas, ficando, também, esses bloqueados. Nestes fenótipos inserem-se a formação de biofilme ou mesmo processos que contribuem para a resistência a antibióticos. Sabemos, hoje em dia, que a probabilidade de desenvolvimento de resistência não é nula. No entanto, como estas técnicas de inibição não exercem elevada pressão seletiva, é expectável que a velocidade de aparecimento seja baixa.

Como o AI-2 é considerado um AI universal, esta estratégia antivirulência pode estar na base de uma terapia de espectro alargado. Sendo que, com base no alvo do inibidor, é possível desenvolver estratégias mais ou menos específicas. A título de exemplo, compostos que interagem com a LuxP são mais específicas para a *V. harveyi*. No entanto, se o alvo for o AI-2, por degradação pela LsrK, afeta, também, a *E. coli* e a *S. typhimurium*. No entanto, é necessário ter em consideração que a ausência de atividade do AI-2, em algumas bactérias, está relacionada com o aumento de patogenicidade. Ou seja, a inibição deste, pode vir a ter efeitos nefastos se alguma destas bactérias estiver presente, como é o caso da *V. cholerae*.

Diversos compostos têm sido identificados como inibidores do sistema de QS dependente de AI-2, para os mais diversos alvos. No entanto, ainda existem muitas questões: Bactérias que apresentam LuxS e não aparentam ter recetor para o AI-2, são capazes de QS ou a enzima existe apenas para o AMC? Se são capazes de QS, será que apresentam recetores que ainda não foram identificados? Se assim for, poderá ser um novo alvo para a inibição. Este exemplo, demonstra a necessidade de determinar em maior

pormenor os mecanismos de QS nas diferentes bactérias. Ao aprofundar os conhecimentos nesta área poderemos determinar novos alvos, a segurança destas abordagens, possíveis efeitos secundários e, também, prever a probabilidade e velocidade de aparecimento de resistência.

## Referências Bibliográficas

- AMARA, N., KROM, B.P., KAUFMANN, G.F., MEIJLER, M.M. - **Macromolecular Inhibition of Quorum Sensing: Enzymes, Antibodies, and Beyond**. *Chemical Reviews*. 111:1 (2011) 195–208.
- ANTUNES, L., CAETANO, M., FERREIRA, R.B.R., BUCKNER, M.M.C., FINLAY, B.B. - **Quorum Sensing in Bacterial Virulence**. *Microbiology*. 156:8 (2010) 2271–2282.
- BADAWY, M.S.E.M., RAID, O.K.M., TAHER, F.A., ZAKI, S.A. - **Chitosan And Chitosan-Zinc Oxide Nanocomposite Inhibit Expression of LasI And RhII Genes and Quorum Sensing Dependent Virulence Factors Of Pseudomonas Aeruginosa**. *International Journal of Biological Macromolecules*. 149 (2020) 1109–1117.
- BAO, Y., LI, Y., JIANG, Q., ZHAO, L., XUE, T., HU, B., SUN, B. - **Methylthioadenosine/S-Adenosylhomocysteine Nucleosidase (Pfs) Of Staphylococcus Aureus Is Essential For The Virulence Independent Of Luxs/AI-2 System**. *International Journal of Medical Microbiology*. 303:4 (2013) 190–200.
- BAO, Y., ZHANG, X., JIANG, Q., XUE, T., SUN, B. - **Pfs Promotes Autolysis-Dependent Release Of eDNA And Biofilm Formation In Staphylococcus Aureus**. *Medical Microbiology and Immunology*. 204:2 (2015) 215–226.
- BRACKMAN, G., COENYE, T. - **Quorum Sensing Inhibitors as Anti-Biofilm Agents**. *Current Pharmaceutical Design*. 21:1 (2015) 5–11.
- BZDRENGA, J., DAUDÉ, D., RÉMY, B., JACQUET, P., PLENER, L., ELIAS, M., CHABRIÈRE, E. - **Biotechnological Applications Of Quorum Quenching Enzymes**. *Chemico-Biological Interactions*. 267 (2017) 104–115.
- CAO, M., FENG, Y., WANG, C., ZHENF, F., LI, M., LIAO, H., MAO, Y., PAN, X., WANG, J., HU, D., HU, F., TANG, J. - **Functional Definition Of Luxs, An Autoinducer-2 (AI-2) Synthase And Its Role In Full Virulence Of Streptococcus Suis Serotype 2**. *Journal of Microbiology*. 49:6 (2011) 1000–1011.
- CHBIB, C., SOBCZAK, A.J., MUDGAL, M., GONZALEZ, C., LUMPUY, D., NAGAJ, J., STOKOWA-SOLTYS, K., WNUK, S.F. - **S-Ribosylhomocysteine Analogues Modified At The Ribosyl C-4 Position**. *Journal of Sulfur Chemistry*. 37:3 (2016) 307–327.

- CHEN, L., WILKSCH, J.J., LIU, H., ZHANG, X., TORRES, V.V.L., BI, W., MANDELA, E., CAO, J., LI, J., LITHGOW, T., CHOU, T. - **Investigation Of Luxs-Mediated Quorum Sensing In *Klebsiella pneumoniae***. *Journal of Medical Microbiology*. 69:3 (2020) 402–413.
- DEFOIRDT, T., PANDE, G.S.J., BARUAH, K., BOSSIER, P. - **The Apparent Quorum-Sensing Inhibitory Activity Of Pyrogallol Is A Side Effect Of Peroxide Production**. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 57:6 (2013) 2870–2873.
- DEFOIRDT, TOM - **Quorum-Sensing Systems As Targets For Antivirulence Therapy**. *Trends in Microbiology*. 26:4 (2018) 313–328.
- DEFOIRDT, T., BOON, N., BOSSIER, P. - **Can Bacteria Evolve Resistance To Quorum Sensing Disruption?**. *PLoS Pathogens*. 6:7 (2010).
- EVANS, G.B., TYLER, P.C., SCHRAMM, V.L. - **Immucillins In Infectious Diseases**. *ACS Infectious Diseases*. 4:2 (2018) 107–117.
- FETZNER, S. - **Quorum Quenching Enzymes**. *Journal of Biotechnology*. 201 (2015) 2–14.
- GALLOWAY, W., HODGKINSON, J.T., BOWDEN, S.D., WELCH, M., SPRING, D.R. - **Quorum Sensing In Gram-Negative Bacteria: Small-Molecule Modulation Of Ahl And Ai-2 Quorum Sensing Pathways**. *Chemical Reviews*. 111:1 (2011) 28–67.
- GARCÍA-CONTRERAS, R., MAEDA, T., WOOD, T.K. - **Can Resistance Against Quorum-Sensing Interference Be Selected?**. *The ISME Journal*. 10:1 (2016) 4–10.
- GARCÍA-CONTRERAS, R., MAEDA, T., WOOD, T.K. - **Resistance To Quorum-Quenching Compounds**. *Applied and Environmental Microbiology*. 79:22 (2013) 6840–6846.
- GRANDCLÉMENT, C., TENNIÈRES, M., MORÉRA, S. DESSAUX, Y., FAURE, D. - **Quorum Quenching: Role In Nature And Applied Developments**. *FEMS Microbiology Reviews*. 40:1 (2015) 86–116.
- GUTIERREZ, J.A., CROWDER, T., RINALDO-MATTHIS, A., HO, M.C., ALMO, S.C., SCHRAMM, V.L. - **Transition state analogs of 5'-methylthioadenosine nucleosidase disrupt quorum sensing**. *Nature Chemical Biology*. 5:4 (2009) 251–257.
- HAAPALAINEN A.M., THOMAS, K., TYLER, P.C., EVANS, G.B., ALMO, S.C., SCHRAMM, V.L. - **Salmonella Enterica MTAN At 1.36a Resolution. Structure-Based Design Of New Transition State Analogues**. *Structure*. 21:6 (2013) 963–974.

HAQUE, S., AHMAD, F., DAR, S.A., JAWED, A., MANDAL, R.K., WAHID, M., LOHANI, M., KHAN, S., SINGH, V., AKHTER, N. - **Developments In Strategies For Quorum Sensing Virulence Factor Inhibition To Combat Bacterial Drug Resistance.** Microbial Pathogenesis. 121 (2018) 293–302.

JIANG, Q., CHEN, J., YANG, C., YIN, Y., YAO, K. - **Quorum Sensing: A Prospective Therapeutic Target for Bacterial Diseases.** BioMed Research International. 2019 (2019).

KALIA, V.C., WOOD, T.K., KUMAR, P. - **Evolution Of Resistance To Quorum-Sensing Inhibitors.** Microbial Ecology. 68:1 (2014) 13–23.

KALIA, V.C. - **Quorum Sensing Inhibitors: An Overview.** Biotechnology Advances. 31:2 (2013) 224–245.

KANG, S., KIM, J., HUR, J.K., LEE, S.S. - **CRISPR-Based Genome Editing Of Clinically Important *Escherichia coli* SE15 Isolated From Indwelling Urinary Catheters Of Patients.** Journal of Medical Microbiology. 66:1 (2017) 18–25.

LONGSHAW, A.I., ADANITSCH, F., GUTIERREZ, J.A., EVANS, G.B., TYLER, P.C., SCHRAMM, V.L. - **Design And Synthesis Of Potent "Sulfur-Free" Transition State Analogue Inhibitors Of 5'-Methylthioadenosine Nucleosidase And 5'-Methylthioadenosine Phosphorylase.** Journal of Medicinal Chemistry. 53:18 (2010) 6730–6746.

LOWERY, C.A., ABE, T., PARK, J., EUBANKS, L.M., SAWADA, D., KAUFMANN, G.F., JANDA, K.D. - **Revisiting AI-2 Quorum Sensing Inhibitors: Direct Comparison Of Alkyl-DPD Analogs And A Natural Product Fimbrilide.** Journal of the American Chemical Society. 131:43 (2009).

LU, H.C., SPIEGEL, A.C., HURLEY, A., PEREZ, L.J., MAISEL, K., ENSIGN, L.M., HANES, J., BASSLER, B.L., SEMMELHACK, M.F., PRUD'HOMME, R.H. - **Modulating *Vibrio cholerae* Quorum-Sensing-Controlled Communication Using Autoinducer-Loaded Nanoparticles.** Nano Letters. 15:4 (2015) 2235–2241.

MA, L., FENG, S., FUENTE-NÚÑEZ, C.D.L., HANCOCK, R.E.W., LU, X. - **Development Of Molecularly Imprinted Polymers To Block Quorum Sensing And Inhibit Bacterial Biofilm Formation.** ACS Applied Materials and Interfaces. 10:22 (2018) 18450–18457.

- MALLADI, V.L., SOBCZAK, A.J., MEYER, T.M., PEI, D., WNUK, S.F. - **Inhibition Of Luxs By S-Ribosylhomocysteine Analogues Containing A [4-aza]ribose Ring.** *Bioorganic and Medicinal Chemistry.* 19:18 (2011) 5507–5519.
- MANGWANI, N., DASH, H.R., CHAUHUAN, A., DAS, S. - **Bacterial Quorum Sensing: Functional Features And Potential Applications In Biotechnology.** *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology.* 22:4 (2012) 215–227.
- FLEITAS MARTÍNEZ, O., RIGUEIRAS, P.O., PIRES, Á.D.S., PORTO, W.F., SILVA, O.N., FUENTE - NUNEZ, C., FRNACO, O.L. - **Interference With Quorum-Sensing Signal Biosynthesis As A Promising Therapeutic Strategy Against Multidrug-Resistant Pathogens.** *Frontiers in cellular and infection microbiology.* 8 (2018) 444.
- MELLINI, M., MUZIO, E., D'ANGELO, F., BALDELLI, V., FERRILLO, S., VISCA, P., LEONI, L., POLITICELLI, F., RAMPIONI, G. - **In Silico Selection And Experimental Validation Of FDA-Approved Drugs As Anti-Quorum Sensing Agents.** *Frontiers in Microbiology.* 10 (2019) 1–14.
- MINA, G., CHBIB, C. - **Recent Progresses On Synthesized Luxs Inhibitors: A Mini-Review.** *Bioorganic and Medicinal Chemistry.* 27:1 (2019) 36–42.
- PAPENFORT, K., BASSLER, B.L. - **Quorum Sensing Signal-Response Systems In Gram-Negative Bacteria.** *Nature Reviews Microbiology.* 14:9 (2016) 576–588.
- PARVEEN, N., CORNELL, K.A. - **Methylthioadenosine/S-Adenosylhomocysteine Nucleosidase, A Critical Enzyme For Bacterial Metabolism.** *Molecular Microbiology.* 79:1 (2012) 7–20.
- PEREIRA, C.S., THOMPSON, J.A., XAVIER, KB. - **AI-2-Mediated Signalling In Bacteria.** *FEMS Microbiology Reviews.* 37:2 (2013) 156–181.
- RABIN, N., ZHENG, Y., OPOKU-TEMENG, C., DU, Y., BONSU, E., SINTIOM, H.O. - **Biofilm Formation Mechanisms And Targets For Developing Antibiofilm Agents.** *Future Medical Chemistry.* 7:4 (2015) 493–512.
- REZZONICO, F.; SMITS, T.H., DUFFY, B. - **Detection Of AI-2 Receptors In Genomes Of Enterobacteriaceae Suggests A Role Of Type-2 Quorum Sensing In Closed Ecosystems.** *Sensors (Basel).* 12:5 (2012) 6645–6665.



- ROY, V., FERNANDES, R., TSAO, C., BENTLEY, W.E. - **Cross Species Quorum Quenching Using A Native AI-2 Processing Enzyme.** ACS Chemical Biology. 5:2 (2010) 223–232.
- ROY, V., SMITH, J.A. I., WANG, J., STEWART, J.E., BENTLEY, W.E., SINTIM, H.O. - **Synthetic Analogs Tailor Native AI-2 Signaling Across Bacterial Species.** Journal of the American Chemical Society. 132:32 (2010) 11141–11150.
- ROY, V., MEYER, M.T., SMITH, J.A.I., GAMBY, S., SINTOM, H.O., GHODSSI, R., BENTLEY, W.E. - **AI-2 Analogs And Antibiotics: A Synergistic Approach To Reduce Bacterial Biofilms.** Applied Microbiology and Biotechnology. 97:6 (2013) 2627–2638.
- ROY, V., ADAMS, B.L., BENTLEY, W.E. - **Developing next generation antimicrobials by intercepting AI-2 mediated quorum sensing.** Enzyme and Microbial Technology. 49:2 (2011) 113–123.
- RUI, F., MARQUES, J.C., MILLER, S.T., MAYCOCK, C.D., XAVIER, K.B., VENTURA, M.R. - **Stereochemical Diversity Of AI-2 Analogs Modulates Quorum Sensing In *Vibrio harveyi* And *Escherichia coli*.** Bioorganic and Medicinal Chemistry. 20:1 (2012) 249–256.
- RÜTSCHLIN, S., BÖTTCHER, T. - **Inhibitors of Bacterial Swarming Behavior.** Chemistry - A European Journal. 26:5 (2020) 964–979.
- SCHRAMM, V.L. - **Enzymatic Transition States And Drug Design.** Chemical Reviews. 118:22 (2018) 11194–11258.
- SILVA, A.J., PARKER, W.B., ALLAN, P.W., AYALA, J.C., BENITEZ, J.A. - **Role Of Methylthioadenosine/S-Adenosylhomocysteine Nucleosidase In *Vibrio cholerae* Cellular Communication And Biofilm Development.** Biochemical and Biophysical Research Communications. 461:1 (2015) 65–69.
- SMITH, J.A. I., WANG, J., NGUYEN-MAU, S.M., LEE, V., SINTIM, H.O. - **Biological Screening Of A Diverse Set Of AI-2 Analogues In *Vibrio harveyi* Suggests That Receptors Which Are Involved In Synergistic Agonism Of AI-2 And Analogues Are Promiscuous.** Chemical Communications. 45 (2009) 7033–7035.
- SOBCZAK, A.J., CHBIB, C., WNUK, S.F. - **S-Ribosylhomocysteine Analogs Containing A [4-thio]ribose Ring.** Carbohydrate Research. 415 (2015) 39–47.

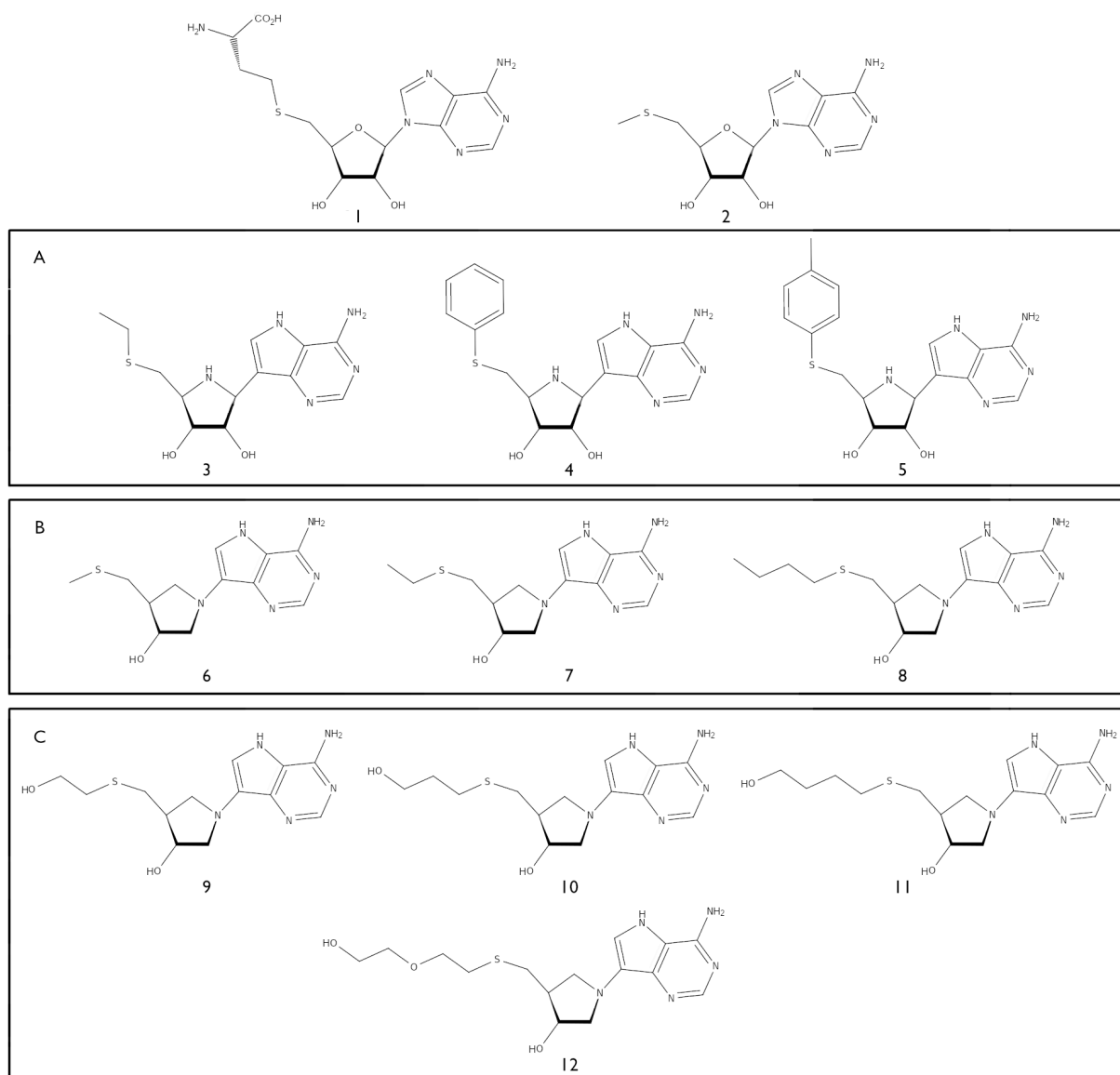
- STOTANI, S., GATTA, V., MEDARAMETLA, P., PADMANABAN, M., KARAWAJSZYK, A., GIORDANETTO, F., TAMMELA, P., LAITINEM, T., POSO, A., TZALIS, D., COLLINA, S. - **DPD-Inspired Discovery Of Novel LsrK Kinase Inhibitors: An Opportunity To Fight Antimicrobial Resistance.** *Journal of Medicinal Chemistry.* 62:5 (2019) 2720–2737.
- SUBRAMANIAN, S., GERASOPOULOS, K., GUO, M., SINTIM, H.O., BENTLEY, W.E., GHODSSI, R. - **Autoinducer-2 Analogs And Electric Fields - An Antibiotic-Free Bacterial Biofilm Combination Treatment.** *Biomedical Microdevices.* 18:5 (2016) 1–12.
- SUN, B.; ZHANG, M. - **Analysis Of The Antibacterial Effect Of An *Edwardsiella tarda* Luxs Inhibitor.** *SpringerPlus.* 5:1 (2016) 1–6.
- TANG, K.; ZHANG, X.H. - **Quorum Quenching Agents: Resources For Antivirulence Therapy.** *Marine Drugs.* 12:6 (2014) 3245–3282.
- TEREN, M., TURONOVA MICHOVA, H., LUCIE, V., DEMNEROVA, K. - **Molecules Autoinducer 2 And Cja And Their Impact On Gene Expression In *Campylobacter jejuni*.** *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology.* 28:5 (2018) 207–215.
- WANG, Y., WANG, Y., SUN, L., GRENIER, F., YI, L. - **The Luxs / Ai-2 System Of *Streptococcus suis*.** *Applied Microbiology and Biotechnology.* 102:17 (2018) 7231–7238.
- WANG, Y., LIU, B., GRENIER, D., YI, L. - **Regulatory Mechanisms Of The Luxs/Ai-2 System And Bacterial Resistance.** *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* 63:10 (2019) e01186-19.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION - **Antibiotic resistance.** Geneva: WHO, 2018 [Acedido a 18 de maio de 2020]. Disponível na Internet: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/antibiotic-resistance>
- ZHANG, M., JIAO, X.D., HU, Y.H., SUN, L. - **Attenuation Of *Edwardsiella tarda* Virulence By Small Peptides That Interfere With Luxs/Autoinducer Type 2 Quorum Sensing.** *Applied and Environmental Microbiology.* 75:12 (2009) 3882–3890.
- ZHAO, J., QUAN, C., JIN, L., CHEN, M. - **Production, Detection And Application Perspectives Of Quorum Sensing Autoinducer-2 In Bacteria.** *Journal of Biotechnology.* 268 (2018) 53–60.
- ZHAO, X., YU, Z., DING, T. - **Quorum-Sensing Regulation Of Antimicrobial Resistance In Bacteria.** *Microorganisms.* 8:3 (2020) 1–21.

ZHU, P., LI, M. - **Recent Progresses On AI-2 Bacterial Quorum Sensing Inhibitors.** Current Medicinal Chemistry. 19:2 (2012) 174–186.

ZUBERI, A., MISBA, L.; KHAN, A.U. - **CRISPR Interference (CRISPRi) Inhibition Of Luxs Gene Expression In *E. coli*: An Approach To Inhibit Biofilm.** Frontiers in Cellular and Infection Microbiology. 7 (2017) 1–7.

## Anexos

**Anexo I** – Inibidores da enzima MTA/SAH nucleosidase. (Adaptado de Haapalainen *et al.*, 2013; Zhu e Li, 2012).



1. SAH

2. MTA

### Secção A

3. 5'-etiltio-Imm-A

4. 5'-feniltio-Imm-A

5. p-metilfeniltio-Imm-A

### Secção B

6. 5'-metiltio-DADMe-Imm-A

7. 5'-etiltio-DADMe-Imm-A

8. 5'-butiltio-DADMe-Imm-A

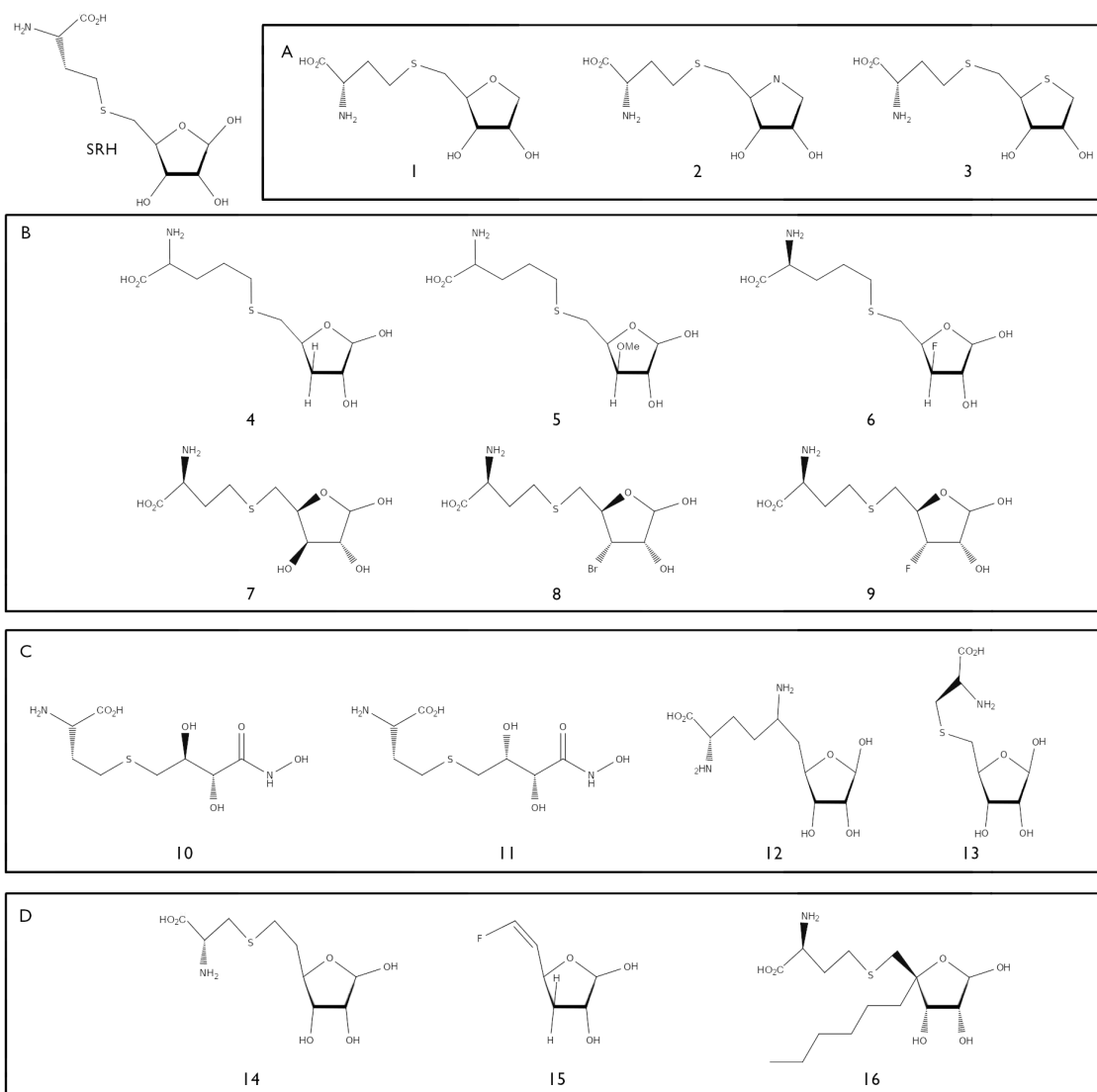
### Secção C

9. 2-hidroxi-etiltio-DADMe-Imm-A

10. 3-hidroxipropiltio-DADMe-Imm-A

11. 4-hidroxibutiltio-DADMe-Imm-A

**Anexo II – Inibidores da enzima LuxS análogos do SRH. (Adaptado de Chbib *et al.*, 2016; Galloway *et al.*, 2011; Malladi *et al.*, 2011; Sobczak *et al.*, 2015).**



**Secção A**

1. S-anidroribosyl-L-homocisteína
2. S-(1-amino-1,4-anidro-1,5-didesóxi-D-ribitol-5-il)-L-homocisteína
3. S-(1,5-didesóxi-4-tio-D-ribofuranos-5-il)-L-homocisteína

**Secção B**

4. S-(3,5-didesóxi-D-eritropentofuranos-5-il)-homocisteína
5. S-(5-desóxi-3-O-metil-D-xilofuranos-5-il)-homocisteína
6. S-(3,5-didesóxi-3-flúor-D-xilofuranos-5-il)-homocisteína
7. S-(5-desóxi-D-xilofuranos-5-il)-homocisteína
8. S-(3-bromo-3,5-didesóxi-D-ribofuranos-5-il)-L-homocisteína
9. S-(3-flúor-3,5-didesóxi-D-ribofuranos-5-il)-L-homocisteína

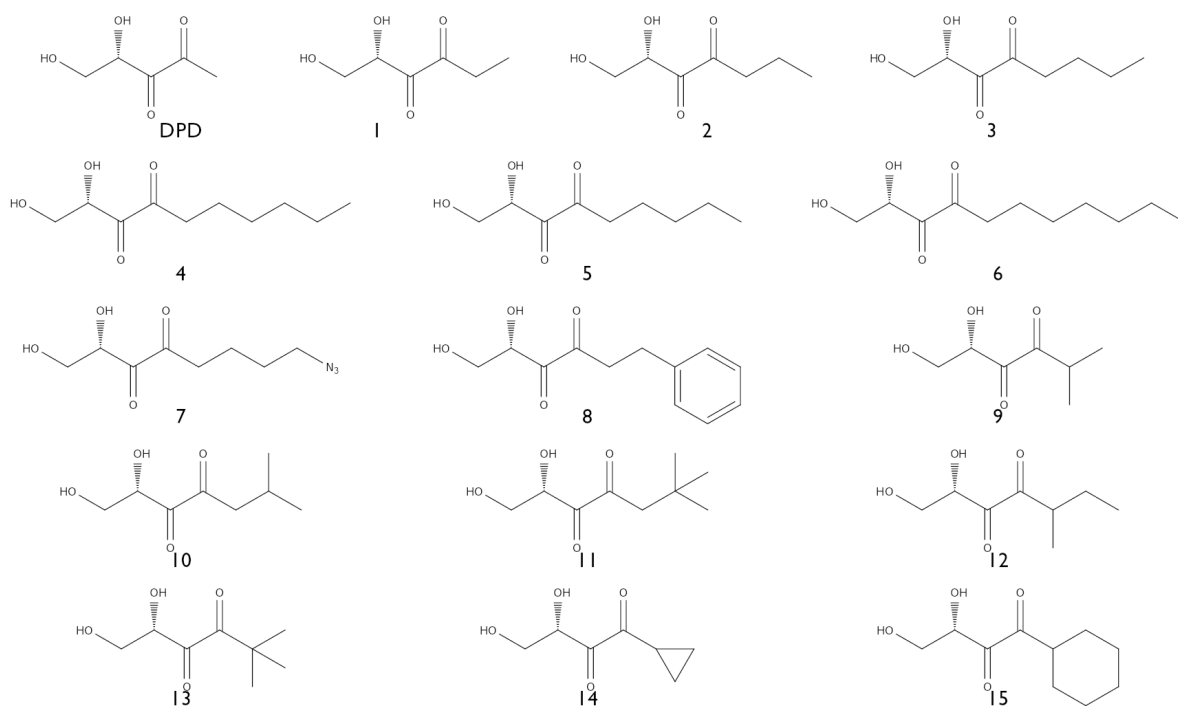
**Secção C**

10. Ácido (2S)-2-amino-4-[(2R,3S)-2,3-dihidroxi-3-N-hidroxi-carbamil-propiltio]-butírico
11. Ácido (2S)-2-amino-4-[(2R,3R)-2,3-dihidroxi-3-N-hidroxi-carbamil-propiltio]-butírico
12. S-ribosilcisteína
13. δ-ribosilornitina

**Secção D**

14. S-homoribisil-L-cisteína
15. 3,5,6-tridesóxi-6-flúor-D-eritro-hex-5-enofuranose
16. S-(5-desóxi-4-C-hexil-D-ribofuranos-il)-L-homocisteína

**Anexo III** – Compostos inibidores análogos do DPD. (Adaptado de Galloway *et al.*, 2011; Roy, Smith *et al.*, 2010).



1. Etil-DPD

2. Propil-DPD

3. Butil-DPD

4. Hexil-DPD

5. Pentil-DPD

6. Heptil-DPDB

7. Azidobutil-DPD

8. Fenil-DPDC

9. Isopropil-DPD

10. Isobutil-DPD

11. 2,2-dimetilpropil

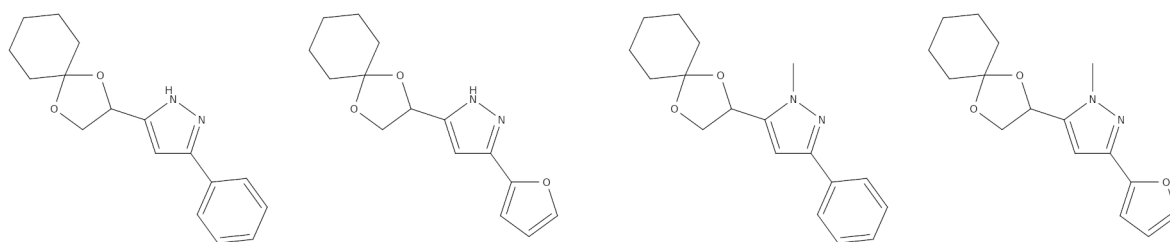
12. 1-metilpropil-DPD

13. Terc-butil-DPD

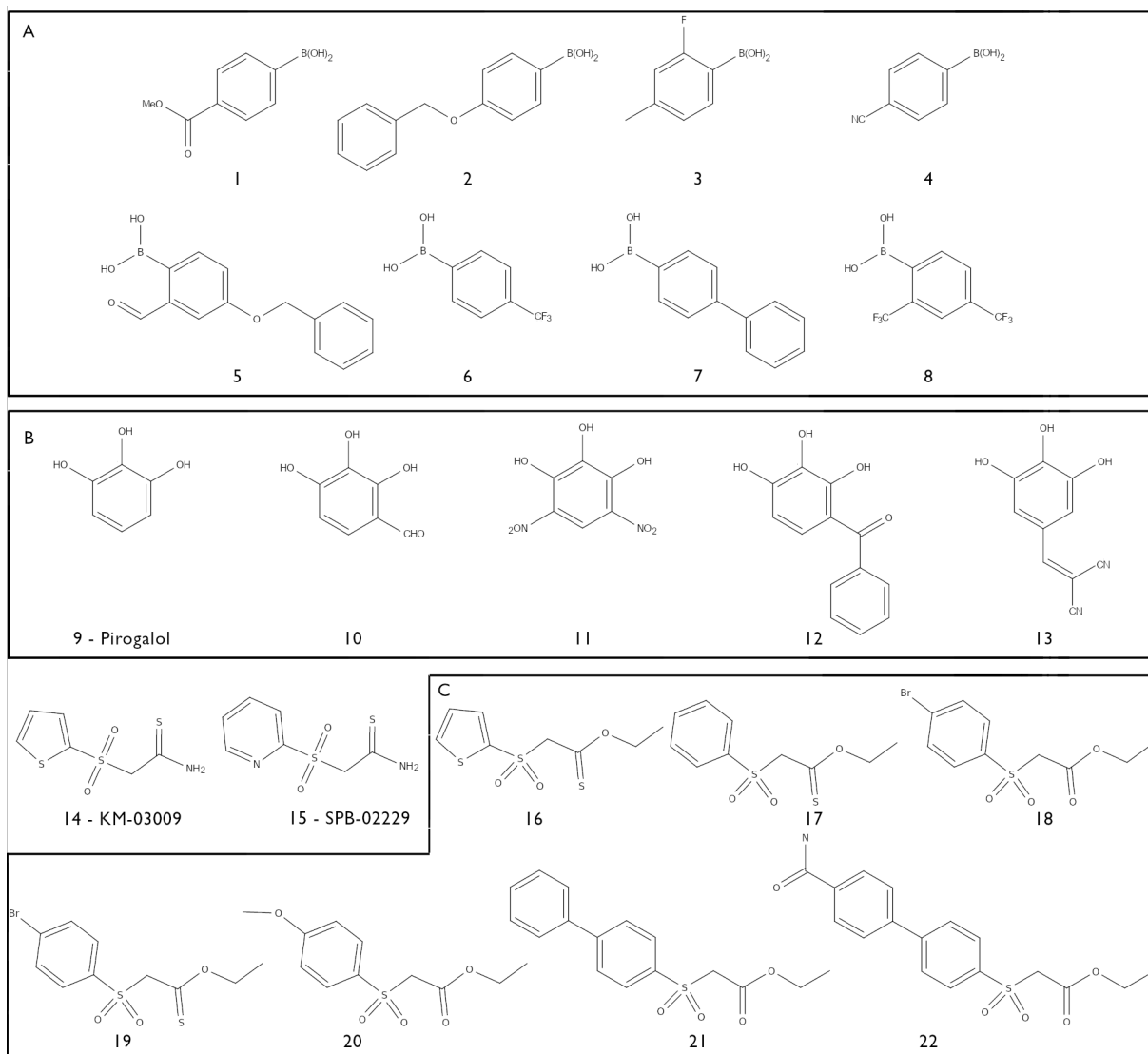
14. Ciclopropil-DPD

15. Ciclo-hexil-DPD

**Anexo IV** – Compostos inibidores derivados do DPD. (Adaptado de Stotani *et al.*, 2019).



**Anexo V – Compostos inibidores da LuxP. (Adaptado de Galloway et al., 2011).**

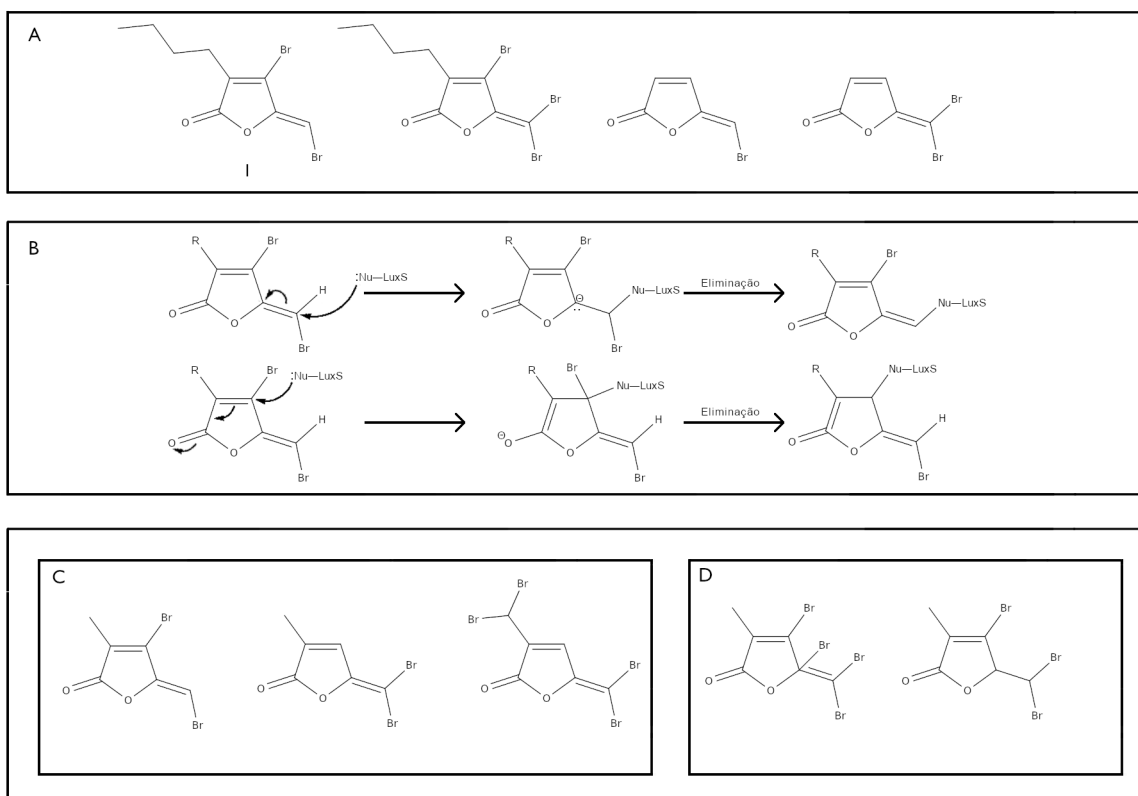


**Secção A – Derivados do ácido bórico**

**Secção B – Compostos diol aromáticos**

**Compostos 14 e 15 e Secção C – Sulfonas**

**Anexo VI – Furanonas halogenadas inibidoras do sistema QS dependente de AI-2. (Adaptado de Galloway et al., 2011).**



**Secção A – Furanonas halogenadas naturais**

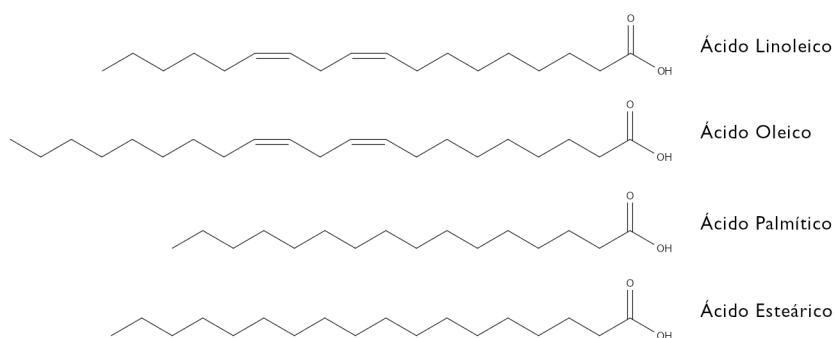
I.(5Z)-4-bromo-5-(di-bromometileno)-3-butil-2(5H)-furanona

**Secção B – Mecanismo de inibição da LuxS pelas furanonas halogenadas**

**Secção C – Furanonas halogenadas sintéticas ativas**

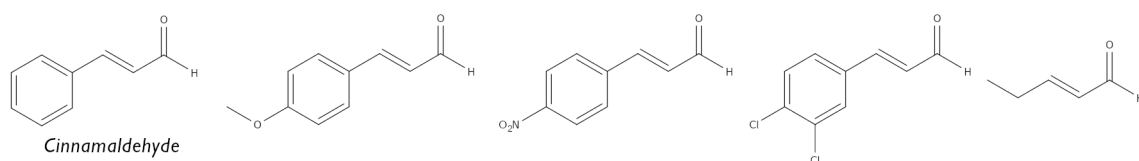
**Secção D – Furanonas halogenadas sintéticas inativas**

**Anexo VII – Ácidos Gordos inibidores do sistema de QS dependente de AI-2. (Adaptado de Galloway et al., 2011).**





**Anexo VIII** – Aldeídos cinâmicos e derivados como inibidores do sistema de QS dependente de AI-2. (Adaptado de Zhu e Li, 2012).



**Anexo IX** – Compostos do sumo de toranja com atividade inibitória do sistema de QS. (Adaptado de Galloway et al., 2011).

