



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE LONDRINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
Colegiado do CURSO de CIÊNCIAS BIOLÓGICAS



**Ciências
Biológicas**
UEL

TRABALHO DE CONCLUSÃO DO CURSO DE GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

SARA LARSEN DOS SANTOS

PRODUÇÃO, EXTRAÇÃO, PURIFICAÇÃO E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE PQS (*Pseudomonas Quinolone Signal*)

Londrina – Paraná

2024

**TRABALHO DE CONCLUSÃO DO CURSO DE GRADUAÇÃO
EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

SARA LARSEN DOS SANTOS

**PRODUÇÃO, EXTRAÇÃO, PURIFICAÇÃO E
AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE PQS
(*Pseudomonas Quinolone Signal*)**

Monografia apresentada ao Curso de Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Estadual de Londrina como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas.

Orientadora: Profa. Dra. Josiane A. Vignoli Camilios

Londrina – Paraná

2024

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

S243p SANTOS, SARA LARSEN .
Produção, extração, purificação e avaliação da atividade antioxidante de PQS (*Pseudomonas Quinolone Signal*). / SARA LARSEN SANTOS. - Londrina, 2024.
34 f.

Orientador: JOSIANE VIGNOLI.
Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Ciências Biológicas) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Graduação em Ciências Biológicas, 2024.
Inclui bibliografia.

1. *Pseudomonas aeruginosa* - TCC. 2. Fermentação submersa - TCC. 3. Extração ácido-base - TCC. 4. Radical DPPH - TCC. I. VIGNOLI, JOSIANE . II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Graduação em Ciências Biológicas. III. Título.

CDU 66

SARA LARSEN DOS SANTOS

**PRODUÇÃO, EXTRAÇÃO, PURIFICAÇÃO E AVALIAÇÃO DA
ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE PQS (*Pseudomonas Quinolone
Signal*)**

Monografia apresentada ao Curso de Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Estadual de Londrina como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Orientadora: Profa. Dra. Josiane A.
Vignoli Camilios
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof. Dr. Luis Paulo Silveira Alves
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof. Dr. Marcelo Rodrigues de Melo
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Londrina, 08 de maio de 2024.

“A persistência é o caminho do êxito.”

Charles Chaplin

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me conceder sabedoria e força ao longo do percurso.

Aos meus pais, Sandra e Gilberto, e ao meu irmão, Lucas, por suas palavras de encorajamento, pelo apoio e por me incentivarem a acreditar na minha capacidade.

A minha orientadora Profa. Dra. Josiane A. Vignoli Camilios, pela sua paciência, orientação, dedicação e apoio. Suas instruções foram fundamentais para o desenvolvimento deste trabalho, e sou imensamente grata por toda sua orientação ao longo de todo o processo.

Ao curso de Ciências Biológicas e aos professores, pelo aprendizado ao longo do curso, e por contribuírem com a minha formação profissional e crescimento pessoal.

Aos meus colegas de laboratório, em especial à Thaísa, pela colaboração, troca de ideias e apoio.

RESUMO

SANTOS, Sara Larsen. **Produção, extração, purificação e avaliação da atividade antioxidante de PQS (*Pseudomonas Quinolone Signal*)**. 2024. 34. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Ciências Biológicas) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina. 2024.

A bactéria *Pseudomonas aeruginosa*, comumente encontrada em diversos ambientes, é reconhecida por sua capacidade de causar infecções em humanos, principalmente em ambientes hospitalares. A patogênese da *P. aeruginosa* é mediada por fatores de virulência que afetam a adesão e a sinalização da célula hospedeira, sendo regulada pelo *quorum sensing*, um mecanismo de controle da densidade celular que envolve os sistemas Las, Rhl e quinolonas, e, moléculas sinalizadoras como o PQS. As quinolonas têm sido objeto de estudo na comunicação intracelular bacteriana, influenciando a regulação gênica. Embora o PQS tenha sido identificado como um antioxidante, há uma escassez de estudos que explorem seu potencial antioxidante. Neste trabalho, foi realizada a obtenção de PQS por fermentação de *P. aeruginosa* e a avaliação de sua atividade antioxidante *in vitro* utilizando o método de DPPH. A produção de PQS foi realizada em cultivos submersos de *P. aeruginosa*. Posteriormente, os extratos foram submetidos à extração ácido-básica (pH 2,0 e 11,0), utilizando acetato de etila como solvente orgânico. A purificação da molécula de PQS foi realizada por cromatografia em camada delgada preparativa. Os resultados da análise antioxidante usando o método de DPPH indicaram que tanto o PQS quanto o extrato bruto ácido apresentavam baixa capacidade antioxidante. No entanto, o extrato básico demonstrou uma inibição significativa do radical DPPH sugerindo a presença de outros compostos com capacidade antioxidante. Entretanto, ao avaliar a capacidade de inibição do radical DPPH do extrato básico sem PQS, esta amostra não apresentou atividade significativas de inibição do radical.

Palavras-chave: *Pseudomonas aeruginosa*; Fermentação submersa; Extração ácido-base; Radical DPPH•.

ABSTRACT

SANTOS, Sara Larsen. **Production, extraction, purification, and evaluation of the antioxidant activity of PQS (*Pseudomonas* *Quinolone* *Signal*)**. 2024. 34. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Ciências Biológicas) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina. 2024.

The bacterium *Pseudomonas aeruginosa*, commonly found in various environments, is recognized for its ability to cause infections in humans, particularly in hospital settings. The pathogenesis of *P. aeruginosa* is mediated by virulence factors that affect host cell adhesion and signaling, regulated by *quorum sensing* a cell density control mechanism involving the Las, Rhl, and quinolone systems, and signaling molecules such as PQS. Quinolones have been studied for their role in bacterial intracellular communication, influencing gene regulation. Although PQS has been identified as an antioxidant, there is a scarcity of studies exploring its antioxidant potential. In this work, PQS was obtained through the fermentation of *P. aeruginosa* and its antioxidant activity was evaluated in vitro using the DPPH method. PQS production was carried out in submerged cultures of *P. aeruginosa*. Subsequently, the extracts were subjected to acid-base extraction (pH 2.0 and 11.0), using ethyl acetate as the organic solvent. The purification of the PQS molecule was performed by preparative thin-layer chromatography. The results of the antioxidant analysis using the DPPH method indicated that both PQS and the crude acidic extract exhibited low antioxidant capacity. However, the basic extract showed significant DPPH radical inhibition, suggesting the presence of other compounds with antioxidant capacity. Nevertheless, when evaluating the DPPH radical inhibition capacity of the basic extract without PQS, this sample did not show significant radical inhibition activity.

Keywords: *Pseudomonas aeruginosa*; Submerged fermentation; Acid-base extraction; DPPH• radical.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura química do PQS.....	15
Figura 2 - Estrutura das moléculas de quinolonas sinalizadoras do QS.....	16
Figura 3 - Interação dos sistemas de defesa enzimáticas	18
Figura 4 - Esquema do processo de obtenção de PQS com fermentação submersa	21
Figura 5 - Esquema do processo de extração ácido-base	22
Figura 6 – Cromatografia em Cada Delgada analítica do extrato bruto orgânico básico.....	25
Figura 7 –CCDs preparativas do extrato bruto orgânico básico	25

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Massas dos extratos brutos	24
Tabela 2 - Massa da molécula de PQS	26
Tabela 3 - Porcentagem de Inibição do radical DPPH•.....	26

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABS	Absorbância
CCD	Cromatografia em camada delgada
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DPPH-H	2,2-difenilpicril-hidrazina
DPPH•	1,1-difenil-2-picrilhidrazil
ERNs	Espécies reativas de nitrogênio
EROs	Espécies reativas de oxigênio
HHQ	4-hidroxi-2-heptil-quinolonas
IQS	Integrated quórum sensing system
LB	Luria bertani
NF-KB	Fator nuclear kappa B
pH	Potencial hidrogênico
PQS	Pseudomone Quinolone Signal
QS	<i>quorum sensing</i>
UV	Ultravioleta
% IA	Porcentagem de Inibição do Radical DPPH•

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	REVISÃO DE LITERATURA	14
2.1	PSEUDOMONAS AERUGINOSA	14
2.2	PSEUDOMONAS QUINOLONE SIGNAL	15
2.3	RADICAIS LIVRES E ANTIOXIDANTES	17
2.4	MÉTODOS DE AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE	19
3	MATERIAL E MÉTODOS	20
3.1	MATERIAL	20
3.1.1	Material de consumo	20
3.1.3	Material biológico	20
3.2	MÉTODOS	20
3.2.1	Obtenção de PQS por fermentação submersa com <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	20
3.2.2	Extração ácido/básica	21
3.2.3	Confirmação da presença de PQS	22
3.2.4	Purificação do PQS	22
3.2.5	Avaliação da atividade antioxidante <i>in vitro</i> do PQS	23
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	24
5	CONCLUSÕES	28
	REFERÊNCIAS	29

1 INTRODUÇÃO

A molécula 2-heptil-3-hidroxi-4-quinolona, também conhecida como *Pseudomonas Quinolone Signal* (PQS), é sintetizado pela bactéria *Pseudomonas aeruginosa*, uma bactéria gram-negativa aeróbica, com formato de bacilo, que pode ser encontrada em diversos ambientes naturais e artificiais como água, solo, plantas, tecidos de mamíferos, ralos de pias domésticas e hospitais. Este microrganismo oportunista é responsável por diversas infecções em humanos, principalmente, infecções hospitalares em pacientes submetidos à respiração mecânica (LIN et al., 2018; TUON et al., 2022).

A patogênese causada por *P. aeruginosa* é mediada pela ação de vários fatores de virulência bacteriana que coordenam a adesão e/ou interrompem as vias de sinalização da célula hospedeira (VALENTINI et al., 2018). A síntese dos fatores de virulência é regulada pelo *quorum sensing* (QS), que é um mecanismo de controle da densidade celular. A *P. aeruginosa* possui três sistemas QS independentes: Las, Rhl e quinolonas (PQS) (CHADHA; HARJAI; CHHIBBER, 2022; CORNELIS, 2020; XUAN et al., 2022).

Devido ao seu mecanismo de controle de densidade celular, as quinolonas estão sendo aplicadas em estudos de comunicação intracelular bacteriana, no qual, estas coordenadamente regulam a transcrição de vários genes (HENTZER et al., 2003; RAMPIONI et al., 2010; SMITH; IGLEWSKI, 2003). Além disso, o PQS foi identificado como antioxidante (HÄUSSLER; BECKER, 2008), entretanto nota-se a escassez de estudos que avaliem o potencial antioxidante desta molécula.

A presente pesquisa visa a obtenção de PQS por fermentação submersa de *P. aeruginosa*, com a finalidade de avaliar *in vitro* sua atividade antioxidante, por meio do método de DPPH.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 PSEUDOMONAS AERUGINOSA

A *Pseudomonas aeruginosa* é uma bactéria gram-negativa, que apresenta formato de bacilo e é um organismo aeróbio. Este microrganismo é amplamente distribuído na natureza, sendo encontrado em diversos ambientes, como água, solo, plantas, tecidos de mamíferos, e ralos de pias domésticas e hospitalares. Reconhecida como um patógeno oportunista, esta bactéria está frequentemente associada a infecções hospitalares, causando uma variedade de problemas de saúde a exemplo septicemia, fibrose cística, pneumonia associada à ventilação mecânica (PAV) e diversas outras infecções (JURADO-MARTÍN; SAINZ-MEJÍAS; MCCLEAN, 2021; THI; WIBOWO; REHM, 2020; XUAN et al., 2022; LIN et al., 2008; TUON et al., 2018).

A capacidade de adaptação da *P. aeruginosa*, aliada à sua resistência aos antibióticos, a torna um desafio significativo para o tratamento médico, levando a uma intensa área de pesquisa, visto que, seu controle é realizado pela ação de diversos fatores de virulência bacteriana que regulam a adesão e/ou interrompem as vias de sinalização da célula hospedeira (VALENTINI et al., 2018).

Um aspecto crucial do seu comportamento patogênico é o *quorum sensing* (QS), um mecanismo de monitoramento de densidade celular; este sistema regula a expressão de genes, incluindo aqueles relacionados à virulência, quando a densidade celular atinge níveis críticos (STRATEVA; MITOV, 2011). Normalmente, os sistemas QS bacterianos induzem a síntese e liberação de pequenos sinais químicos, que em altas densidades populacionais, se acumulam e interagem com receptores; os sinais liberados pelas bactérias são coletados e interagem com receptores cognatos para estimular a expressão de vários genes-alvo, incluindo os genes que codificam a geração de fatores de virulência (LEE; ZHANG, 2015).

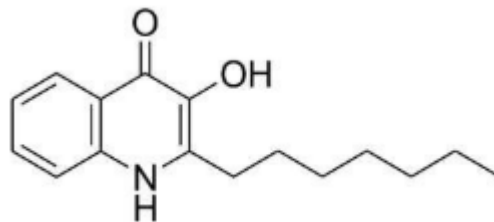
A *P. aeruginosa* apresenta três sistemas QS que funcionam de forma independente: Las, Rhl e quinolonas (PQS). Durante a última década, houve especulações sobre um quarto sistema dependente de IQS, entretanto atualmente sabe-se que o IQS é um aeruginaldeído e um subproduto da biossíntese ou degradação da pioquelina (CHADHA; HARJAI; CHHIBBER, 2022; CORNELIS, 2020; XUAN et al., 2022)

O sistema Las sintetiza moléculas sinalizadoras, como a N-(3-oxododecanoil)-l-homoserina lactona (3O-C12-HSL), enquanto o sistema Rhl produz a lactona C4-homoserina (C4-HSL). Já o sistema PQS, por sua vez, é composto pelo sinal 2-heptil-3-hidroxi-4-quinolona (PQS) ou seu precursor, 2-heptil-4-quinolona (HHQ). Essas moléculas desempenham um papel crucial na regulação de genes de virulência, exoenzimas e no desenvolvimento do biofilme de *P. aeruginosa*, que é um mecanismo de resistência e persistência da bactéria em ambientes hostis (LEE; ZHANG, 2015; XUAN et al., 2022).

2.2 PSEUDOMONAS QUINOLONE SIGNAL

A molécula 2-heptil-3-hidroxi-4-quinolona (Figura 1), também conhecida como *Pseudomonas Quinolone Signal*, é uma das moléculas sinalizadoras do sinalizadora do *quorum sensing* de *P. aeruginosa*; têm como função facilitar adaptação ambiental em nível populacional. As quinolonas estão sendo aplicadas em estudos de comunicação intracelular bacteriana, no qual, estas regulam a transcrição de vários genes (HENTZER et al., 2003; RAMPIONI et al., 2010; SMITH; IGLEWSKI, 2003).

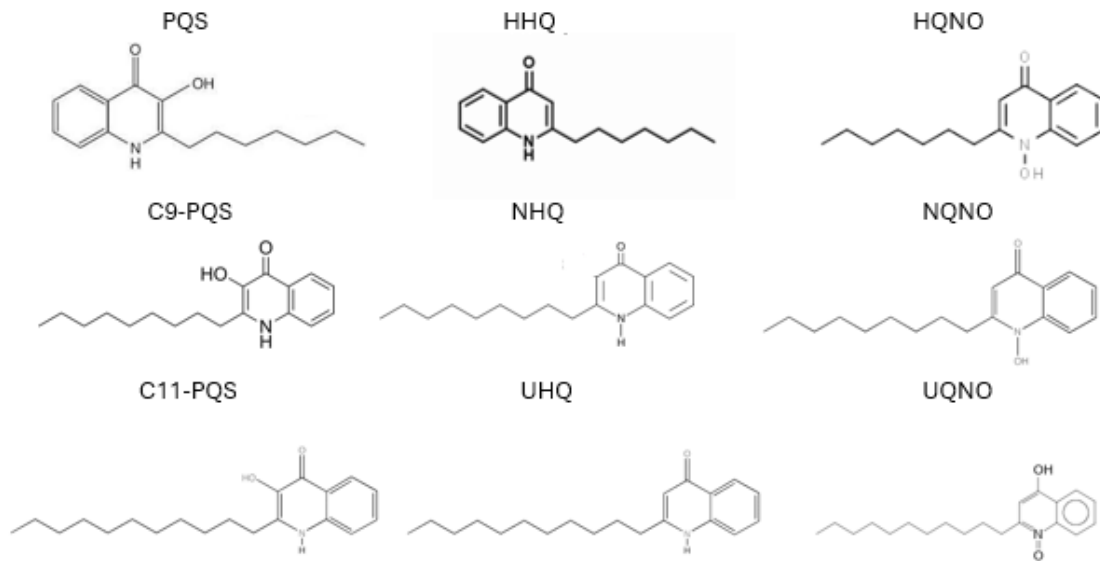
Figura 1 - Estrutura química do PQS



Fonte: Bueno, 2021.

Na literatura, as quinolonas, geralmente, são apresentadas contendo cadeias laterais de carbono: carbono-7 (C7) (HHQ, PQS e HQNO), carbono-9 (C9; NHQ, C9-PQS e NQNO) e carbono-11 (C11; UHQ, C11-PQS e UQNO) (Figura 2) (LÉPINE et al., 2004).

Figura 2 - Estrutura das moléculas de quinolonas sinalizadoras do QS



Fonte: O autor.

Essas moléculas são essenciais para a regulação de genes que codificam exoenzimas, exotoxinas, lectinas, metabólitos secundários (como por exemplo piocianina, cianeto de hidrogênio, ramnolipídeos, pioquelina e pioverdina) e formação do biofilme. As quinolonas também interagem com o sistema imunológico do hospedeiro, de modo que, são capazes de modular as respostas imunes e inflamatórias, entretanto, para adaptação com êxito no ambiente, *P. aeruginosa* precisa suprimir a indução do sistema imunológico. Em vista disso, essas moléculas demonstram que além de regular os genes de virulências, também são importantes por interagirem com células eucarióticas e modulam respostas imunes (HEEB et al., 2011; TATEDA et al., 2003).

O PQS foi purificado e identificado por Pesci e colaboradores. Esta molécula exerce um papel adicional na modulação da resposta imune, reprimindo a ativação do fator de transcrição NF- κ B e, conseqüentemente, a expressão de genes relacionados às vias da resposta imune em mamíferos. Além disso, devido à sua estrutura PQS foi identificado como antioxidante por Häussler e Becker (PESCI et al., 1999; KIM et al., 2010; HÄUSSLER; BECKER, 2008).

2.3 RADICAIS LIVRES E ANTIOXIDANTES

O consumo natural de oxigênio pelos seres vivos aeróbicos resulta em processos oxidativos. Em condições normais, o organismo humano é capaz de neutralizar as espécies reativas de oxigênio (ERO) geradas de maneira fisiológica, por meio de sistemas antioxidantes, desse modo evitando possíveis danos causados aos substratos oxidáveis devido aos efeitos do oxigênio (HALLIWELL, 2011).

Os radicais livres são caracterizados por elétrons desemparelhados no orbital atômico, que conseqüentemente, conferem alta reatividade em moléculas químicas, para este radical atingir sua forma estável é necessário que outro elétron fazendo ligação no orbital (HALLIWELL, 2009). Espécies reativas derivadas de oxigênio (definidos como EROs) e espécies reativas derivadas de nitrogênio (definidos como ERNs) são produzidas durante a respiração e pela função imune, atuando como ativadores de sinalização celular (VALKO et al., 2007). A exposição à radiação UV também intensifica a formação de EROs, causando danos ao DNA, peroxidação lipídica e degradação protéica, resultando em estresse oxidativo (GUARATINI et al., 2007; WEI et al., 2002).

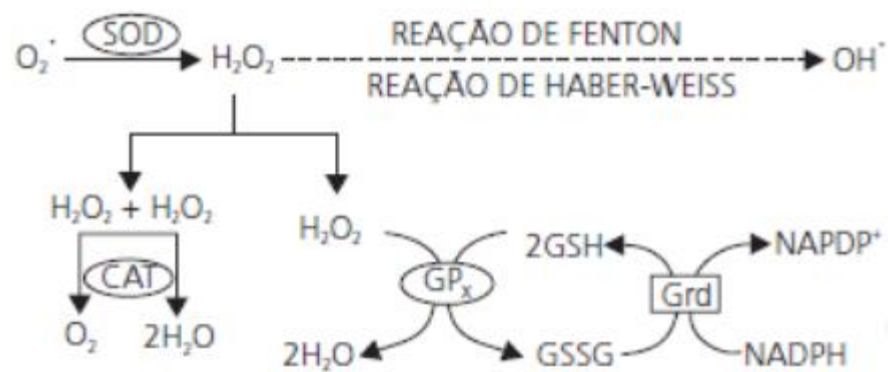
Os antioxidantes desempenham um papel crucial na proteção contra os efeitos nocivos da oxidação; sendo definidos como substâncias que, em concentrações inferiores ao substrato oxidável têm a capacidade de reduzir ou prevenir a oxidação desse substrato (GÁLVEZ, 2010; WANG et al., 2010). Os compostos antioxidantes são capazes de inibir a reação em cadeia de oxidação devido seu papel como doadores de hidrogênio ou aceitadores de radicais livres, sintetizando radicais mais estáveis.

Os sistemas antioxidantes podem ser divididos conforme seu mecanismo de ação: (1) antioxidantes preventivos, que interferem no processo de iniciação, retardando ou interrompendo a formação inicial de espécies radicais; (2) mecanismo de reparação que atuam interrompendo as reações de oxidação, isto é, os antioxidantes reagem mais rapidamente com radicais livres do que o substrato oxidável; (3) os antioxidantes que atuam na reparação dos danos estruturais ocasionados pelas espécies reativas (WU; KOSTEN; ZHANG, 2013; VALGIMIGLI, 2012).

As células têm um sistema robusto para lidar com grande parte do dano oxidativo. A integridade celular é mantida por enzimas como a superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutaciona peroxidase (GPx) e glutaciona redutase (GRx)

(SHINDO et al., 1994). SOD catalisa a quebra do superóxido em oxigênio molecular (O_2) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2) enquanto a catalase e glutatona peroxidase convertem peróxido de hidrogênio em água e oxigênio molecular, completando assim a tarefa da SOD (Figura 3) (LEPHART, 2016). Ácido ascórbico, ácido úrico, glutatona (GSH), ubiquinol-10 e α -tocoferol são algumas das moléculas do sistema antioxidante não enzimático, que atuam como neutralizadores de radicais livres através de doação de elétrons ou através de transferência de hidrogênio (SHINDO et al., 1994).

Figura 3 - Interação dos sistemas de defesa enzimáticas



Fonte: Adaptada de Barbosa et al., 2010.

Entretanto, quando se instala o estresse oxidativo, é importante a suplementação das células com antioxidantes endógenos: as moléculas antioxidantes incluem minerais, vitaminas e fitoquímicos, a exemplo flavonóides, catequinas, carotenóides, β -caroteno, licopeno, diterpeno e seus derivados. Estes compostos interagem com uma variedade de mecanismos: ligação de íons metálicos, eliminação de espécies reativas de oxigênio, conversão de hidroperóxidos em espécies não radicais, absorção de radiação UV ou desativação de oxigênio singlete (MOHARRAM et al., 2014). A molécula de PQS também teve sua atividade antioxidante demonstrada em estudos realizados por HÄUSSLER; BECKER, 2008, onde a presença de PQS diminui significativamente a absorbância do radical livre DPPH, demonstrando o seu potencial como antioxidante.

2.4 MÉTODOS DE AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

Por conta de sua importância, vários métodos químicos foram desenvolvidos para avaliação da capacidade antioxidante. A diferença entre cada um destes métodos está relacionada com os mecanismos das reações químicas: (1) reações de transferência de átomo de hidrogênio e (2) reações de transferência de elétron único (ANTES; WU; SCHAUCH, 2005).

O método DPPH é utilizado para determinação da capacidade antioxidante *in vitro*, por meio deste teste é possível avaliar a capacidade antioxidante a partir da inibição de radicais livres (MUNTEANU; APETREI, 2021).

O método DPPH foi descrito por Brand-Williams e colaboradores em 1995, este teste consiste na avaliação da atividade redutora do antioxidante em relação ao radical DPPH[•] (2,2-difenil-1-picrilhidrazil) (BRAND-WILLIAMS et., 1995). O radical DPPH[•] apresenta coloração púrpura e absorve a radiação eletromagnética a 517 nm, e é neutralizado quando reage com um antioxidante doador de hidrogênio (fenólicos, vitamina C) formando DPPH-H (2,2-difenilpicril-hidrazina), de coloração amarela; a alteração de cor do radical DPPH na absorbância de 517 nm e a descoloração indicam atividade antioxidante. Quanto menor é a absorbância da mistura reacional, maior é a capacidade antioxidante da amostra (BASCHIERI; AMORATI, 2021). Este radical é solúvel somente em solventes orgânicos, comumente é dissolvido em metanol e etanol (STAŠKO, 2007).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 MATERIAL

3.1.1 Material de consumo

2,2-difenil-1- picrilhidrazil (DPPH•) que foi obtido da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Acetato de etila, diclorometano e todos os demais reagentes utilizados serão de grau analítico.

3.1.2 Material permanente

Balança analítica HR-120, A&d®, precisão de 4 casas; Centrífuga refrigerada Rotina 46 R Hettich Zentrifugen®; Compartimento de madeira projetado para radiação; Deionizador de água Purebal Option-Q Elga®; Espectrofotômetro Evolution 60 Thermo Scientific®; Lâmpada ultravioleta fluorescente PHILIPS TL/12 40W RS-UVB Medical Holand®; Ultra-som TSO, Thornton®.

3.1.3 Material biológico

Bactéria *Pseudomonas aeruginosa* PAO1.

3.2 MÉTODOS

3.2.1 Obtenção de PQS por fermentação submersa com *Pseudomonas aeruginosa*

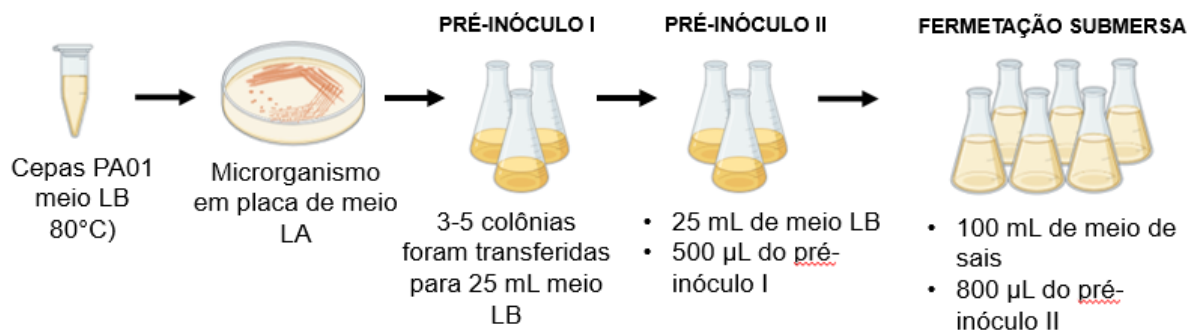
As cepas de *Pseudomonas aeruginosa* foram mantidas em meio Luria-Bertani (LB) (composição por litro: 10 g de triptona, 5 g de extrato de levedura e 10 g de NaCl) adicionado de glicerol (20%, v/v) e armazenada a -80°C. As bactérias foram plaqueadas em meio LA (Caldo Luria Bertani (LB) acrescido de ágar bacteriológico a 1,5% (m/v)) e incubada a 37 °C por 24 horas. Após o crescimento, 3-5 colônias de PAO1 foram transferidas para frascos Erlenmeyers de 125 mL contendo 25 mL de caldo LB e incubadas por 12-16h a 37 °C/200 rpm, originando o primeiro pré-inóculo. Em seguida, 0,5 mL desse primeiro pré-inóculo são transferidos para frascos de 125 mL contendo 25 mL de caldo LB e incubados a 37°C por 5-6h sob agitação de 200 rpm em agitador orbital. Por fim, para os ensaios de fermentação submersa foram utilizados frascos Erlenmeyers de 250 mL, contendo 100 mL de meio de sais (composição por litro: 3,0 g de KH₂PO₄, 7,0 g de K₂HPO₄, 0,2 g de MgSO₄.7H₂O, 1,0

g de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ e glicerol (3% v/v)), os meios de sais foram inoculados com o segundo pré-inóculo em uma concentração de 2% v/v, mantidos em agitador orbital a 37 °C e sob agitação de 200 rpm por 72 horas.

Todo o material utilizado para produção de PQS foi autoclavado a 1 atm, 121°C, por 15 minutos, exceto o material biológico.

A Figura 3 apresenta um esquema ilustrando o processo de obtenção de PQS através de fermentação submersa com *P. aeruginosa*.

Figura 4 - Esquema do processo de obtenção de PQS com fermentação submersa



Fonte: O autor.

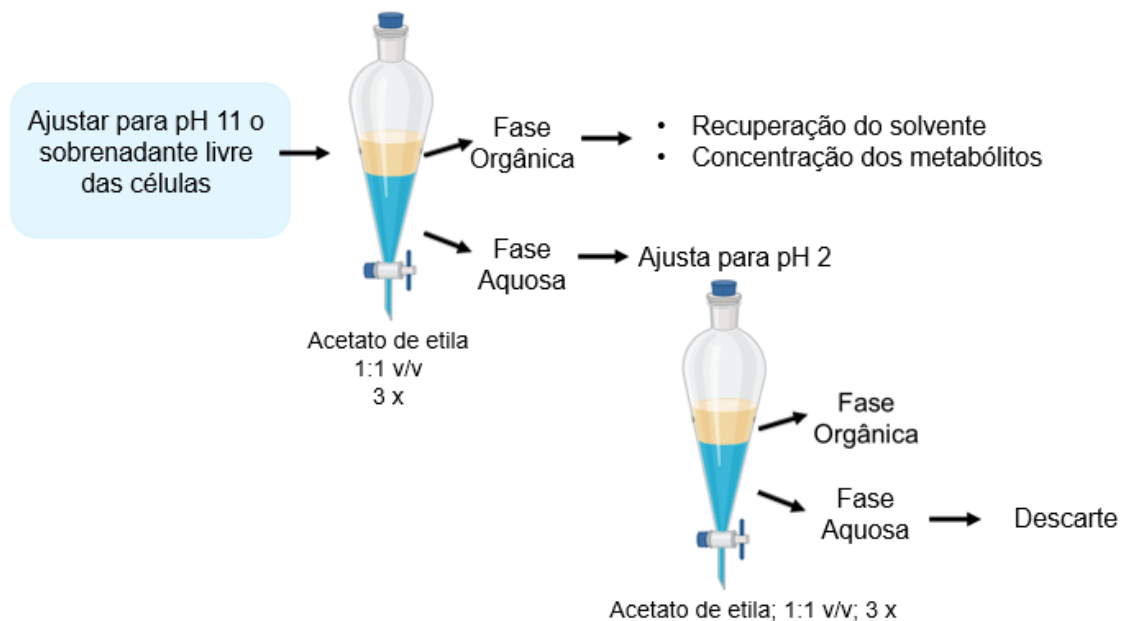
3.2.2 Extração ácido/básica

Após a fermentação, todo o líquido, obtido do processo de fermentação submersa, foi centrifugado a 4 °C em 4500 rpm, por 20 minutos, e, o sobrenadante resultante foi submetido à secagem em estufa a 60 °C por 21 horas, reduzindo significativamente o teor de água em 75 – 80%. Em seguida, o volume restante do meio de cultivo foi submetido a uma extração ácido-base (pH 11 e pH 2), que utilizou acetato de etila como fase orgânica (Figura 4).

Para o processo de extração ácido/básico, conforme Bueno (2021), inicialmente o pH do sobrenadante foi alterado para 11 com a adição de NaOH 1 mol/L, para extração de Quinolonas, e, em seguida, adicionou-se acetato de etila na proporção 1:1 v/v; após a separação de fases, a fase aquosa foi coletada para novamente passar pelo processo de extração com o solvente, enquanto a fase orgânica foi rotaevaporada para concentração de metabólitos e recuperação de solvente; foram realizados 3 lavagens da fase aquosa com acetato de etila.

Posteriormente, o pH da fase aquosa foi ajustado para 2 com adição de HCl 1 mol/L, para extração de Fenazinas; os procedimentos de lavagem com acetato de etila seguiram o mesmo protocolo da extração no pH 11.

Figura 5 - Esquema do processo de extração ácido-base



Fonte: Adaptada de Wessel, 2023.

3.2.3 Confirmação da presença de PQS

Para confirmar a presença de PQS no extrato bruto do pH 11, uma alíquota de 1 μL foi submetida a cromatografia em camada delgada (CCD) analítica, utilizando diclorometano/metanol (95:5) como fase móvel e comparado com um padrão.

3.2.4 Purificação do PQS

As amostras obtidas no processo de extração orgânica em pH 11 foram submetidas à purificação por meio de cromatografia em camada delgada (CCD) preparativa. Para separação por meio de CCD preparativa foram utilizadas placas de vidro (20x20 cm), recobertas com 1,0 mm de sílica gel 60 (Macherey-Nagel P/UV 254) preparada com uma solução de KH_2PO_4 (Fosfato de Potássio Monobásico) a 5% (composição por placa: 15g de sílica e 10 mL de KH_2PO_4) e ativada em estufa a 100 °C por 2 horas (DIGGLES et al., 2003). As amostras foram diluídas com

diclorometano:metanol a 5% (v/v) (DIGGLES et al., 2003). As bandas da placa foram visualizadas usando luz UV; a banda azul fluorescente de interesse foi removida por meio de raspagem com auxílio de espátula e filtrada com diclorometano e metanol, e, armazenadas em frascos de vidro previamente pesados. Posteriormente, as amostras secaram em temperatura ambiente e com auxílio de ventilação. A massa dos compostos purificados foi determinada por gravimetria.

3.2.5 Avaliação da atividade antioxidante *in vitro* do PQS

Para a determinação da atividade antioxidante do PQS, preparou-se uma solução metanólica do PQS purificado nas concentrações de 2 mg/mL.

Os extratos básico e ácido também foram preparados na mesma concentração que o PQS purificado para avaliação da atividade antioxidante.

3.2.5.1 Determinação da atividade antioxidante em relação ao radical DPPH

Para determinação da capacidade antioxidante em relação ao radical DPPH empregou-se o método adaptado de Brand-Williams et al. (1995) seguindo algumas modificações propostas por Nascimento et al. (2020) e Kieling (2016).

Em tubos de ensaio, foram adicionados 1 mL de tampão de acetato de sódio (0,2 mol/L) pH = 5,5, 1 mL de etanol absoluto, 10 µL amostra e 500 µL da solução metanólica de DPPH• (250µM). O controle negativo foi preparado com 500 µL da solução metanólica de DPPH• (250µM), 1 mL de tampão acetato (pH = 5,5) e 1 mL de etanol absoluto. O branco foi composto por 1 mL de tampão e 1 mL de etanol absoluto. O percentual de decréscimo de DPPH foi determinado por meio de absorvância em espectrofotômetro a 517 nm, após 10 minutos de incubação à temperatura ambiente. Todas as medidas foram feitas em triplicata. A capacidade antioxidante foi expressa em porcentagem de DPPH reduzido (%IA), a partir da equação 1.

Equação 1:

$$\% \text{ atividade antioxidante} = \left[1 - \left(\frac{\text{absorvância da amostra}}{\text{absorvância do controle}} \right) \times 100 \right]$$

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

No presente trabalho, utilizou-se a metodologia desenvolvida por Bueno (2021) para o processo de cultivo de *P. aeruginosa* por meio de fermentação submersa. Empregou-se uma composição de meio de cultivo menos complexa e de baixo custo, cujo cultivo de 3 dias resultou em uma produção eficaz das moléculas de PQS com menor quantidade de metabólitos contaminantes, consequentemente, reduzindo a necessidade de processos adicionais de purificação (BUENO, 2021).

A Tabela 1 apresenta a massa, determinada por meio de gravimetria resultante do processo de extração em pH 11 e 2, obtida após o processo de cultivo da bactéria e extração com acetato de etila como solvente orgânico.

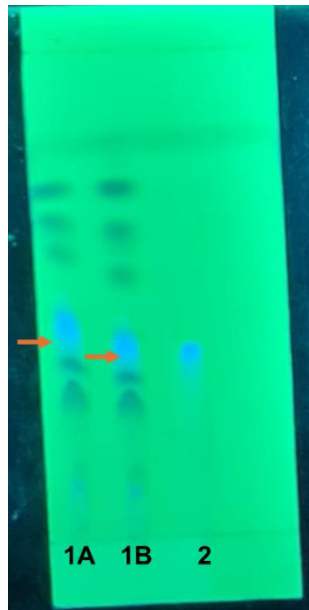
Tabela 1 - Massas dos extratos brutos

Amostra	pH	Rendimento
A1	2,0	81,45 mg
A2	11,0	68,85 mg

A partir de 800 mL do cultivo de *P. aeruginosa* obteve-se 81,45 mg da amostra A1 (extrato bruto pH 2,0) e 68,85 mg da amostra A2 (extrato bruto pH 11,0). A partir de resultados anteriores do grupo (BUENO, 2021) sabe-se que a molécula de PQS é encontrada no extrato de pH 11.

Os extratos brutos orgânicos obtidos na extração básica foram avaliados por cromatografia em camada delgada (CCD) analítica para verificar a presença da molécula de PQS. A Figura 5 apresenta o resultado da CCD analítica que possibilitou verificar a presença de PQS no extrato, utilizando como fase móvel diclorometano:metanol (5%).

Figura 6 – Cromatografia em Cada Delgada analítica do extrato bruto orgânico básico

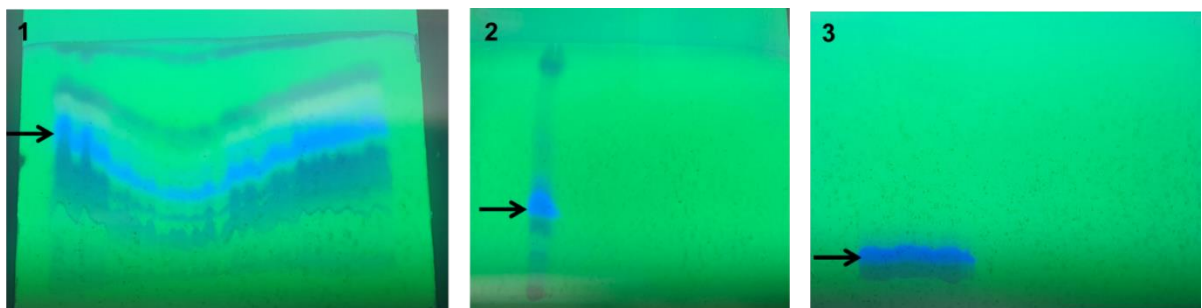


CCD analítica do extrato bruto básico (pH 11) revelado sob luz UV, **(1A) e (1B)** extrato bruto pH 11 e **(2)** padrão de PQS. Foi utilizado como fase móvel diclorometano/metanol (95:5). Setas alaranjadas indicam o composto PQS.

Como se pode observar na figura 5, há presença da molécula de PQS no extrato bruto (pH 11).

Para purificar o PQS foram realizadas CCDs Preparativas nos extratos brutos orgânicos obtidos após a extração básica (pH 11), utilizando como fase móvel clorofórmio:metanol 5%. A Figura 6 evidencia os resultados das CCDs preparativas na amostra.

Figura 7 – CCDs preparativas do extrato bruto orgânico básico



CCDs preparativas do extrato bruto básico (pH 11) utilizando com fase móvel diclorometanol/metanol (95:5), revelados sob luz UV. As placas foram preparadas com sílica gel 60 e fostato monobásico 5%, ativadas a 100°C por 2h; em cada placa de sílica foram aplicados 156,6 mg/mL da amostra, **(1)** primeira purificação da amostra, **(2)** segunda purificação da amostra inicial e **(3)** terceira purificação da amostra inicial. As setas pretas indicam a molécula de PQS.

Por meio da CCD Preparativa (Figura 3), foi possível identificar a molécula de PQS como a banda cuja coloração é azul fluorescente sob luz UV. As bandas de interesse foram delimitadas e retiradas com o auxílio de uma espátula.

Já a tabela 2 mostra a massa do PQS, que também foi determinada através de gravimetria, após cada processo de purificação. Foram realizadas 3 purificações nos metabólitos obtidos na extração orgânica em pH 11.

Tabela 2 - Massa da molécula de PQS

Massa do Extrato Orgânico (pH 11)		Massa da molécula PQS
	1° Purificação	20 mg
68,85 mg	2° Purificação	7,99 mg
	3° Purificação	1,6 mg

Para determinação da capacidade antioxidante da amostra, foi empregado o método do DPPH•, que é baseado na redução do radical DPPH• a DPPH-H devido aos compostos antioxidantes presentes na amostra que reagem com o radical DPPH doando elétrons para neutralizá-lo. A tabela 3 mostra os resultados da absorbância e porcentagem de inibição do radical, obtidos na presença dos extratos e PQS purificado.

Tabela 3 - Porcentagem de Inibição do radical DPPH•

Amostra	Concentração de preparo Amostra	Quant.	Abs ($\lambda = 517 \text{ nm}$)	% IA
Controle			0,456 A	
Extrato ácido	2 mg/mL	10 μL	0,477 A	1,6495
Extrato básico	2 mg/mL	10 μL	0,471 A	2,8179
PQS	2 mg/mL	10 μL	0,465 A	4,1237

Os resultados das absorbância representam a média de três determinações.

Conforme observado na Tabela 3, os valores apresentados pelas amostra analisadas não demonstram capacidade antioxidante importante contra o radical DPPH•. Para o extrato ácido não era esperado poder antioxidante, já que o PQS é

extraído no pH 11. Porém de acordo com a literatura, esperava-se uma capacidade antioxidante maior o PQS e o extrato básico que o contém.

Em estudos realizados por Häussler e Becker, 2008; PQS apresentou a capacidade de inibir o radical DPPH em 80% na concentração de 1mMol. Em nosso estudo o PQS estava no tubo de reação na concentração de 100 µg/mL, aproximadamente 38,5 µmol e apresentou uma inibição de apenas 4% do radical. Infelizmente, esse trabalho não traz detalhes de metodologia DPPH, entretanto em comparação com nossos resultados, a amostra dos autores estaria numa concentração muito maior. De qualquer forma, comparando com resultados de inibição de DPPH por outras amostras, por exemplo, extratos vegetais (VIGNOLI et al. 2011), o PQS não apresenta uma capacidade antioxidante relevante contra o radical DPPH.

5 CONCLUSÕES

O cultivo por meio de fermentação submersa foi adequado para produção da bactéria de PQS por *P. aeruginosa*;

Os métodos de extração e purificação mostraram-se adequados para a obtenção da molécula de PQS, presente no extrato bruto da extração básica;

A molécula de PQS não apresentou capacidade de redução do radical DPPH• à DPPH-H nas seguintes condições avaliadas.

REFERÊNCIAS

AEBI, Hugo. [13] Catalase in vitro. In: **Methods in enzymology**. Academic press, 1984. p. 121-126.

AHMED, F. I.; WAFA, I. A. A.; ASFOUR, H. Z.; EL SAYEH, B. M. The Immune-modulatory and Anti-inflammatory Role of Thymoquinone in UV-irradiated Human Peripheral Blood Mononuclear Cells. **Iranian Journal of Allergy, Asthma, and Immunology**, v. 16(2), p. 156–162, 2017.

ANTES, Felipe Goulart; WU, Jyh-Herng; SCHAOCH, Mauro. Quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*: A critical appraisal. **Indian Journal of Medical Research**, v. 154, n. 4, p. 432-439, 2022.

BACHMANN, L.; BRAGA, G. U. L. Radiação Ultravioleta para a Inativação de Microrganismos em Ambientes Públicos. **Revista Brasileira de Física Médica**, v. 16, p. 605–605, 11 set. 2022.

BARBOSA, Kiriague Barra Ferreira et al. Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. **Revista de nutrição**, v. 23, p. 629-643, 2010.

BARR, H. L. et al. *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing molecules correlate with clinical status in cystic fibrosis. **European Respiratory Journal**, v. 46, n. 4, p. 1046–1054, 1 out. 2015.

BASCHIERI, Andrea; AMORATI, Riccardo. The reaction of DPPH with phenolic antioxidants. **Tetrahedron**, v. 77, n. 24, p. 1629-1633, 2021.

BHATIA, Neehar et al. Role of β -TrCP ubiquitin ligase receptor in UVB mediated responses in skin. **Archives of biochemistry and biophysics**, v. 508, n. 2, p. 178-184, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.abb.2010.12.023>

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **LWT - Food Science and Technology**, v. 28, n. 1, p. 25-30, 1995.

BUENO, Emili Bruna Toso. **Produção, extração e purificação de quinolonas do quorum sensing de *Pseudomonas aeruginosa***. 2021. 48 f. Dissertação de Mestrado pelo Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas, da Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2021.

CHADHA, J.; HARJAI, K.; CHHIBBER, S. Revisiting the virulence hallmarks of *Pseudomonas aeruginosa*: a chronicle through the perspective of quorum sensing. **Environmental Microbiology**, v. 24, n. 6, p. 2630–2656, 1 jun. 2022.

CHANDRA, Priyanka; SHARMA, Rakesh Kumar; ARORA, Daljit Singh. Antioxidant compounds from microbial sources: A review. **Food Research International**, v. 129, p. 108849, 2020.

CORNELIS, P. Putting an end to the *Pseudomonas aeruginosa* IQS controversy.

MicrobiologyOpen, v. 9, n. 2, p. e962, 1 fev. 2020.

GÁLVEZ, J. A. Antioxidants in Food and Their Applications. In: F. Shahidi (Ed.). **Nutraceutical and Functional Food Components**. Boca Raton: CRC Press, 2010. p. 311–351.

DE MORAIS, Alessandra Maria et al. Atividade antioxidante de especiarias in natura e desidratadas no consumo alimentar. **Revista de APS**, v. 21, n. 1, 2018.

DIGGLE, Stephen P. et al. The *Pseudomonas aeruginosa* 4-quinolone signal molecules HHQ and PQS play multifunctional roles in quorum sensing and iron entrapment. **Chemistry & biology**, v. 14, n. 1, p. 87-96, 2007.

DO NASCIMENTO, Rodolfo Ricken et al. Acacia gum candy with *Limosilactobacillus reuteri* and lemongrass essential oil: Effect of storage time on physicochemical characteristics and probiotic survival. **Food Bioscience**, v. 56, p. 103128, 2023.

GÁLVEZ, J. A. Antioxidants in Food and Their Applications. In: F. Shahidi (Ed.). **Nutraceutical and Functional Food Components**. Boca Raton: CRC Press, 2010. p. 311–351.

GULCIN, İlhami. Antioxidants and antioxidant methods: An updated overview. **Archives of toxicology**, v. 94, n. 3, p. 651-715, 2020.

GUARATINI, T.; WOLFRAM, L.; DURÁN, N. Ultraviolet Filters and Antioxidants. In: T. M. T. Politi; G. M. G. da Silva; N. Durán (Ed.). **Environmental Protection Strategies for Sustainable Development**. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2007. p. 191–208.

HALLIWELL, Barry; GUTTERIDGE, John M. C. Free radicals in biology and medicine. Oxford University Press, 2009.

HALLIWELL, Barry. Free radicals in biology and medicine. Oxford University Press, 2011.

HÄUSSLER, S.; BECKER, T. The *Pseudomonas* Quinolone Signal (PQS) Balances Life and Death in *Pseudomonas aeruginosa* Populations. **PLOS Pathogens**, v. 4, n. 9, p. e1000166, set. 2008.

HEEB, S. et al. Quinolones: From antibiotics to autoinducers. **FEMS Microbiology Reviews**, mar. 2011

HENTZER, M. et al. Attenuation of *Pseudomonas aeruginosa* virulence by quorum sensing inhibitors. **EMBO Journal**, v. 22, n. 15, p. 3803–3815, 1 ago. 2003.

HESSLING, M. et al. The impact of far-UVC radiation (200–230 nm) on pathogens, cells, skin, and eyes –a collection and analysis of a hundred years of data. **GMS Hygiene and Infection Control**, v. 16, p. Doc07, 16 fev. 2021.

- HOOI, D. S. W. et al. Differential immune modulatory activity of *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing signal molecules. **Infection and Immunity**, v. 72, n. 11, p. 6463–6470, nov. 2004a
- JURADO-MARTÍN, I.; SAINZ-MEJÍAS, M.; MCCLEAN, S. *Pseudomonas aeruginosa*: An Audacious Pathogen with an Adaptable Arsenal of Virulence Factors. **International Journal of Molecular Sciences** 2021, Vol. 22, Page 3128, v. 22, n. 6, p. 3128, 18 mar. 2021.
- KIM, E. K.; CHOI, E. J. Pathological roles of MAPK signaling pathways in human diseases. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease**, v. 1802, n. 4, p. 396–405, 2010
- LEE, J.; ZHANG, L. The hierarchy quorum sensing network in *Pseudomonas aeruginosa*. **Protein & Cell**, v. 6, n. 1, p. 26–41, 1 jan. 2015
- LÉPINE, F. et al. Electrospray/mass spectrometric identification and analysis of 4-hydroxy-2-alkylquinolines (HAQs) produced by *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of the American Society for Mass Spectrometry**, v. 15, n. 6, p. 862–869, jun. 2004.
- LEPHART, Edwin D. Skin aging and oxidative stress: Equol's anti-aging effects via biochemical and molecular mechanisms. **Ageing research reviews**, v. 31, p. 36-54, 2016.
- LEPHART, Edwin D.; ACERSON, Mark J.; ANDRUS, Merritt B. Synthesis and skin gene analysis of 4'-acetoxy-resveratrol (4AR), therapeutic potential for dermal applications. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 26, n. 14, p. 3258-3262, 2016.
- LIM, H. W. et al. Impact of visible light on skin health: The role of antioxidants and free radical quenchers in skin protection. **Journal of the American Academy of Dermatology**, Impact of Current Gaps in Sun Care on Dermatological Health. v. 86, n. 3, Supplement, p. S27–S37, 1 mar. 2022.
- LIN, Y. T.; JENG, Y. Y.; CHEN, T. L. *Pseudomonas aeruginosa* Infections and Hospitalizations Associated with Disposable Pod Inhaler Use. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 198, n. 10, p. 1359–1361, 2018.
- LISSI, E., SALIMHANNA, M., PASCUAL, C., DELCASTILLO, M. D. Avaliação do potencial antioxidante total (TRAP) e da reatividade antioxidante total a partir de medições de quimiluminescência melhoradas com luminol. *Radicais Livres. Biol. Med.*, 18, 153–158. 1995.
- LÓPEZ-ALARCÓN, Camilo; DENICOLA, Ana. Evaluating the antioxidant capacity of natural products: A review on chemical and cellular-based assays. **Analytica chimica acta**, v. 763, p. 1-10, 2013.
- MOHARRAM, H. A.; YOUSSEF, M. M. Methods for determining the antioxidant activity: a review. **Alexandria Journal of Food Science and Technology**, v. 11, n. 1, p. 31-42, 2014.

MUNTEANU, Irina Georgiana; APETREI, Constantin. Analytical methods used in determining antioxidant activity: A review. **International journal of molecular sciences**, v. 22, n. 7, p. 3380, 2021.

MUNTEANU, Florentina-Daniela; APETREI, Constantin. Antioxidant capacity and polyphenolic content of some commercially available plant-derived products. **Natural Product Research**, v. 35, n. 3, p. 429-433, 2021.

NELSON D. L.; COX M. M. Metabolismo do DNA. In: Lehninger AL. Princípios de Bioquímica do Lehninger. **São Paulo**: Sarvier. . p. 940-84, 2006.

NICHOLS, Joi A.; KATIYAR, Santosh K. Skin photoprotection by natural polyphenols: anti-inflammatory, antioxidant and DNA repair mechanisms. **Archives of dermatological research**, v. 302, p. 71-83, 2010.

PESCI, E. C. et al. Quinolone signaling in the cell-to-cell communication system of *Pseudomonas aeruginosa*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 96, n. 20, p. 11229–11234, 28 set. 1999.

RAMPIONI, G. et al. Transcriptomic analysis reveals a global alkyl-quinolone-independent regulatory role for PqsE in facilitating the environmental adaptation of *Pseudomonas aeruginosa* to plant and animal hosts. **Environmental Microbiology**, v. 12, n. 6, p. 1659– 1673, jun. 2010.

SANTHAKUMAR, J.; MOHAN, B. R.; SAMPATH KUMAR, P.; ARAVIND, J.; ASHOK KUMAR, K. Antioxidant and antimicrobial activities of biosurfactants. **Journal of Pharmacy Research**, v. 9, n. 5, p. 335-339, 2015.

SHINDO, Yasuko et al. Enzymic and non-enzymic antioxidants in epidermis and dermis of human skin. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 102, n. 1, p. 122-124, 1994.

SMITH, R. S.; IGLEWSKI, B. H. P. *aeruginosa* quorum-sensing systems and virulence. **Current Opinion in Microbiology**, v. 6, n. 1, p. 56–60, 1 fev. 2003.

STAŠKO, A., BREZOVÁ, V., BISKUPIČ, S., MIŠÍK, V. As armadilhas potenciais do uso de 1,1-difenil-2-picrilhidrazil para caracterizar antioxidantes em solventes de água mista. **Radicals Livres**. Res., 41, 379–390, 2007.

STRATEVA, T.; MITOV, I. Contribution of an arsenal of virulence factors to pathogenesis of *Pseudomonas aeruginosa* infections. **Annals of Microbiology 2011 61:4**, v. 61, n. 4, p. 717– 732, 15 maio 2011.

TATEDA, K. et al. The *Pseudomonas aeruginosa* autoinducer N-3-oxododecanoyl homoserine lactone accelerates apoptosis in macrophages and neutrophils. **Infection and Immunity**, v. 71, n. 10, p. 5785–5793, 1 out. 2003.

THI, M. T. T.; WIBOWO, D.; REHM, B. H. A. Pseudomonas aeruginosa Biofilms. **International Journal of Molecular Sciences** 2020, Vol. 21, Page 8671, v. 21, n. 22, p. 8671, 17 nov. 2020.

TUON, F. F.; PENTEADO-FILHO, S. R.; AMARANTE, D.; FREIRE, M. P.; FERNANDES, P. F.; GRION, C. M. C. Pseudomonas aeruginosa infections in patients mechanically ventilated for more than 48 hours: A clinical and economic analysis. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 55, e0580, 2022.

VALGIMIGLI, Luca; PRATT, Derek A. Antioxidants in chemistry and biology. Encyclopedia of radicals in chemistry, biology and materials, 2012.

VALKO, M.; LEIBFRITZ, D.; MONCOL, J.; CRONIN, M. T. D.; MAZUR, M.; TELSER, J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 39, n. 1, p. 44-84, 2007.

VALENTINI, Sandro Roberto; DO, Priscila N. P.; ZANONI, Miriam Vieira; MOREIRA, José C. F. Jr. Adherence and Virulence Factors of Pseudomonas aeruginosa Strains Isolated from Infections in Burn Patients. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 51, n. 1, p. 73-78, 2018.

VIGNOLI, J. A.; BASSOLI, D. G.; BENASSI, M. de T. Antioxidant activity, polyphenols, caffeine and melanoidins in soluble coffee: The influence of processing conditions and raw material. **Food chemistry**, v. 124, n. 3, p. 863-868, 2011.

VIGNOLI, Josiane Alessandra et al. Roasting process affects differently the bioactive compounds and the antioxidant activity of arabica and robusta coffees. **Food Research International**, v. 61, p. 279-285, 2014.

XU, Y.; FISHER, G. J. Ultraviolet (UV) light irradiation induced signal transduction in skin photoaging. **Journal of Dermatological Science, Supplement**, v. 2 SUPPL., n. 1, p. 1-8, 2005

XUAN, J. W. et al. Interactions between Pseudomonas aeruginosa quinolones and their implication in infection control. **Journal of Medical Microbiology**, v. 71, n. 10, p. 001560, 2022.

XUAN, G. et al. Quorum Sensing Promotes Phage Infection in Pseudomonas aeruginosa PAO1. **mBio**, v. 13, n. 1, 1 fev. 2022.

WANG, Steven Q.; BALAGULA, Yevgeniy; OSTERWALDER, Uli. Photoprotection: a review of the current and future technologies. **Dermatologic therapy**, v. 23, n. 1, p. 31-47, 2010.

WITKO-SARSAT, Véronique et al. Neutrophils: molecules, functions and pathophysiological aspects. **Laboratory investigation**, v. 80, n. 5, p. 617-653, 2000. DOI: 10.1038/labinvest.3780067

WEI, Yu-Zhu; CAI, Ying-Xia; CHEN, Ming-Xue; DENG, Ji-Nian; KUANG, Guo-Xi; LIU, Xiang-Yong; YUAN, Hui-Hong; GUO, Hai-Bo. Sources and distribution of microplastics in China's largest inland lake--Qinghai Lake. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 71, n. 2, p. 315-323, 2008.

WU, Jing Qin; KOSTEN, Thomas R.; ZHANG, Xiang Yang. Free radicals, antioxidant defense systems, and schizophrenia. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 46, p. 200-206, 2013.