

Redução relativa da motilidade *twitching* de *Pseudomonas aeruginosa* TGC-04 exposta à cafeína

Relative reduction of twitching motility of *Pseudomonas aeruginosa* TGC-04 exposed to caffeine

Clóvis Queiroz Gouveia

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8024-1020>

Universidade Federal da Paraíba

e-mail: clovisqgbio@gmail.com

Bianca Teixeira de Morais Oliveira

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6433-9551>

Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto-SP

e-mail: bianca_texeira@hotmail.com

Ulrich Vasconcelos

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8289-2230>

Universidade Federal da Paraíba

e-mail: u.vasconcelos@cbiotec.ufpb.br

RESUMO

A motilidade *twitching* deixa *Pseudomonas aeruginosa* mover por sobre superfícies bióticas e abióticas, permitindo sua rápida colonização em novas superfícies. Perturbações na motilidade *twitching* influenciam a adesão. Este trabalho teve por objetivo verificar a ação da cafeína sobre a motilidade da linhagem *P. aeruginosa* TGC-04 e em seguida, avaliar a adesão da linhagem exposta à 2064 µg/mL de cafeína, previamente irradiada com luz de LED de alta potência a 700 nm por 10 minutos (1000 mW/cm²). Foram realizados testes de motilidade *swarming*, *swimming* e *twitching* por 48h à 30°C. O biofilme formado após incubação nas mesmas condições foi quantificado pelo método do cristal violeta. A taxa de adesão foi calculada pela diferença da absorbância do tratamento, em relação ao controle. Não houve perturbação nas motilidades *swarming* e *swimming*, contudo, a motilidade *twitching* foi reduzida ≈44%, refletindo na diminuição entre ≈60 e 80% da adesão das células, cujo grau de inibição foi considerado moderado, com as células moderadamente aderidas à superfície. Em complemento, foram identificadas células tipo *swarm*.

Palavras-chave: Bioativos naturais; Biofilme; Motilidade; Atividade antimicrobiana.

ABSTRACT

Twitching motility allows *Pseudomonas aeruginosa* to move over biotic and abiotic surfaces, allowing it to rapidly colonize new surfaces. Disturbances in twitching motility influence adhesion. This work aimed to verify the action of caffeine on the motility of *P. aeruginosa* TGC-04 and to assess the adherence with exposition to caffeine at 2064 µg/mL, previously irradiated with high power LED light at 700 nm for 10 minutes (1000 mW/cm²). Swarming, swimming, and twitching motility tests were carried out for 48h at 30°C. The biofilm formed after incubation under similar conditions was quantified by the crystal violet method. The adherence rate was calculated by the difference in the absorbance of the treatment in comparison to the control. There was no disturbance in swarming and swimming motilities, however, twitching motility was reduced by ≈44%, reflecting a decrease between ≈60 and 80% of cell adhesion, whose degree of inhibition was moderate, with cells moderately adhered to the surface. In addition, the strain was identified as swarm-cell.

Keywords: Natural bioactives; Biofilm; Motility; Antimicrobial activity

INTRODUÇÃO

Pseudomonas aeruginosa é uma extraordinária bactéria que exibe uma grande versatilidade fisiológica e nutricional, as quais permitem sua ocorrência nos mais diversos ambientes (WU et al., 2018). Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), ela também é considerada um patógeno crítico (ASOKAN et al., 2019) e por isso, responsável pela alta prevalência em infecções oportunistas sérias, com elevadas taxas de mortandade e mortalidade (KANG et al., 2003).

O estilo de vida preferencial de *P. aeruginosa* é sésil, como uma organização multicelular aderida (PANDIN et al., 2017). Sua evolução permitiu a expressão de flagelos e *pili* para que permitem um estágio planctônico, bem como afinidade e colonização de superfícies bióticas e abióticas (JURADO-MARTIN et al., 2021). Ambas as motilidade e formação de biofilme são apontados como importantes fatores de virulência em *P. aeruginosa*. Adicionalmente, a formação dos biofilmes atribui menor sensibilidade às moléculas antimicrobianas, permitindo trocas horizontais de genes de resistência (SOUSA et al., 2021).

Por conta da resistência a muitos antibióticos, o controle do crescimento do biofilme é um tema atual e de extensiva pesquisa (AZIZ et al., 2022; CHAKRABORTY et al., 2020; SHAO et al., 2020). Com olhos voltados à sustentabilidade, diferentes moléculas biodegradáveis são mais atrativas, em termos da exploração com a finalidade de controlar o desenvolvimento de patógenos (JORDAN e GATHERGOOD, 2013). A cafeína é uma molécula cuja atividade antimicrobiana foi demonstrada em bacilos Gram-negativos (CARNEIRO et al., 2020; ALMEIDA et al., 2006; RAMANAVIÉNE et al., 2003), motivando nosso estudo ao utilizá-la irradiada com energia luminosa de LED, fundamentada nos princípios da quimioterapia fotodinâmica antimicrobiana (PACT), estratégia que permite a produção de espécies reativas de oxigênio que se ligam a estruturas microbianas vitais, resultando na inativação ou morte da célula (AROSO et al., 2019). Dessa forma, este estudo objetivou verificar a ação da PACT mediada pela cafeína sobre a motilidade e a colonização da linhagem selvagem *P. aeruginosa* TGC04, como parte do projeto de caracterização desta linhagem.

METODOLOGIA

Cafeína

Foi utilizada cafeína anidra (Jilin Shulan Synthetic Pharmaceutical, Co. LTD, China – grau de pureza 99,9%), cuja solução-estoque foi preparada em água destilada esterilizada para obtenção de concentração de 5000 µg/mL. A concentração utilizada nos testes, 2064 µg/mL, foi baseada em um trabalho prévio de nosso grupo de pesquisa que verificou uma Concentração Mínima Inibitória da cafeína nesta concentração (GOUVEIA et al., 2023).

Uma alíquota de 10 mL da solução de cafeína foi transferida para uma placa de Petri esterilizada e em seguida, irradiada por 10 minutos com lâmpada de LED de alta frequência (A-60, G-light), 3W, luz RGB ($\lambda = 700$ nm), distanciando 16 cm da fonte luminosa. Observou-se que a energia irradiada sobre a cafeína foi de aproximadamente 1000 mW/cm².

Microrganismo

O estudo foi conduzido com a linhagem de *P. aeruginosa* TGC-04 (cadastro no SisGen, Brasil # A6D0C2F. Esta linhagem foi isolada de solo (CAVALCANTI et al., 2019) e um extenso trabalho de sua caracterização vem sendo realizado por nosso grupo de pesquisa.

Ensaio de motilidade

Três testes foram realizados em agar BHI adicionado com cafeína irradiada. Uma suspensão de *P. aeruginosa* TGC-04 de cultivo recente foi preparada com turbidez padronizada ao tubo nº 0,5 da escala de McFarland e em seguida, inoculada para o agar BHI semissólido (verificação da motilidade *swimming*), na superfície do agar BHI (verificação da motilidade *swarming*) e no fundo da placa de Petri, posteriormente sendo transferido agar BHI (verificação da motilidade *twitching*) (ROSSI et al., 2018). As placas foram incubadas por 48 h à 30±1 °C e após, mediu-se o diâmetro da zona de deslocamento (mm) a partir do ponto de inoculação. O controle do teste foi realizado com meios sem cafeína.

Ensaio *in vitro* da formação do biofilme

O ensaio foi realizado em triplicata pela técnica do cristal violeta (KHARE e ARORA, 2011). Em tubos de microdiluição contendo 1000 μL de caldo Müller-Hinton, foram adicionados 100 μL da solução de cafeína na concentração-teste e 10 μL do inóculo, preparado como descrito acima. A incubação ocorreu por 48 h em 30 ± 1 °C. Após o período, o sobrenadante foi descartado e as paredes dos tubos foram lavadas vigorosamente com água de torneira. Depois de secas, transferiu-se 1500 μL de cristal violeta 1% e após 20 min, o corante foi removido e os tubos novamente lavados com água de torneira, secados e preenchidos com 1500 μL de etanol puro. Após 30 minutos, a densidade óptica (OD) da solução cristal violeta-etanol foi determinada a 590 nm (Quimis, U2M). O controle do teste foi realizado sem a cafeína.

O percentual de inibição da adesão foi calculado pela diferença entre as médias das OD do tratamento com cafeína e do controle, dividido pela OD do controle e multiplicando por 100. Com isso a adesão foi classificada como fraca (se $\leq 40\%$), moderada (entre 40 e 80%) ou forte (se $\geq 80\%$) (RODRIGUES et al., 2010).

Análise estatística

Todos os ensaios foram realizados em triplicata e os resultados apresentados como a média \pm erro.

RESULTADOS

Ensaio da motilidade

A Tabela 1 sumariza os resultados dos ensaios de motilidade. Observou-se que as motilidades *swimming* e *swarming* não sofreram alterações, em detrimento da motilidade *twitching* que registrou redução significativa entre 37 e 44% após exposição à cafeína.

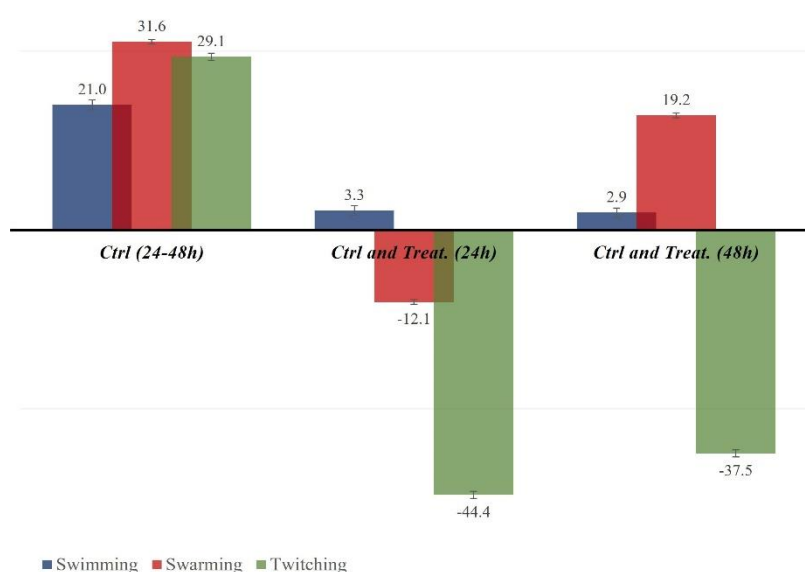
Tabela 1 – Zonas de deslocamento (mm ± erro) de *Pseudomonas aeruginosa* TGC-04 exposta a 2064 µg/mL de cafeína

Motilidade	24 h		48 h	
	Controle	TGC-04	Controle	TGC-04
<i>Swimming</i>	23,6 ± 4,4	24,5 ± 3,4	30,0 ± 8,7	30,9 ± 4,8
<i>Swarming</i>	15,8 ± 2,4	14,1 ± 0,6	23,1 ± 5,5	28,6 ± 5,7
<i>Twitching</i>	23,4 ± 1,9	16,2 ± 0,1	33,0 ± 0,5	24,0 ± 0,6

Fonte: Gouveia; Oliveira e Vasconcelos (2023)

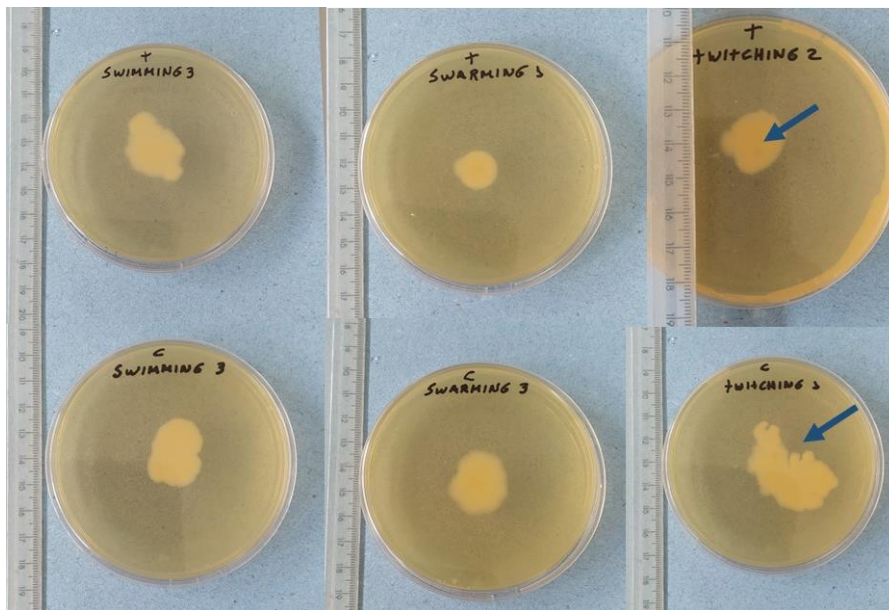
A variação nas diferenças percentuais sobre a ação da cafeína na motilidade de *P. aeruginosa* TGC-04 é mais bem observada nas Figuras 1 e 2. Ao comparar os resultados do controle com o tratamento em cada intervalo (24 e 48h), notou-se que *P. aeruginosa* TGC-04 formou uma colônia de células tipo *swarm*, com alterações importantes na motilidade *twitching*. Observou-se igualmente uma diferença nos resultados da motilidade *swarming* em 24h. Contudo, ao serem considerados os desvio e erro padrões do ensaio, essa aparente redução na motilidade se anula, realçando a observação inicial de que a cafeína na concentração testada, 2064 µg/mL, teve ação mais sobre a motilidade *twitching*.

Figura 1 – Percentual do aumento e redução das zonas de deslocamento da *Pseudomonas aeruginosa* TGC-04 exposta à cafeína (*Treat.*) e no controle (*Ctrl*) em até 48 h



Fonte: Gouveia; Oliveira e Vasconcelos (2023)

Figura 2 – Zonas de deslocamento da *Pseudomonas aeruginosa* TGC-04 (48h). Na fileira de cima, quando exposta à cafeína (*Treat.*) e na fileira de baixo, o controle (*Ctrl.*). As setas azuis destacam a motilidade *twitching*

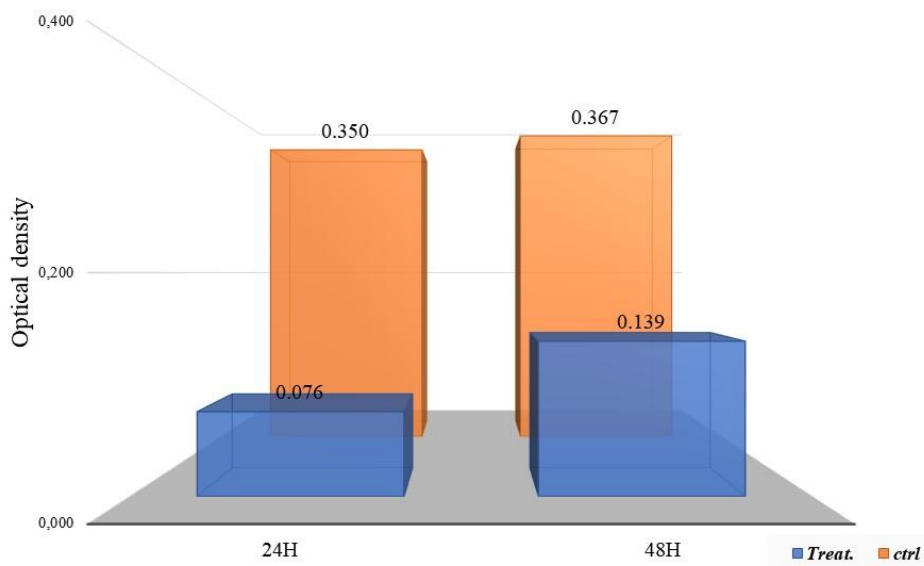


Fonte: Gouveia; Oliveira e Vasconcelos (2023)

Ensaio *in vitro* de formação do biofilme

Foi observada em 48h uma redução importante, em mais de 60%, da colonização de *P. aeruginosa* TGC-04, comparada ao controle, como é ilustrado na Figura 3 (redução nas primeiras 24h $\approx 80\%$). Mesmo havendo um aumento entre os intervalos 24 e 48h, nota-se uma aparente perturbação em termos da adesão, pela qual pode se correlacionar com as observações no teste de motilidade, em especial, das modalidades *swarming* e *twitching*.

Figura 3 – Formação de biofilme de *Pseudomonas aeruginosa* TGC-04 exposta a 2064 µg/mL de cafeína (*treat.*) em comparação ao controle (*Ctrl*) (erro ± 0.08)



Fonte: Gouveia; Oliveira e Vasconcelos (2023)

Como a Figura 3 parece demonstrar que a cafeína pareceu ser mais ativa nas primeiras 24h, na Tabela 2 estão sumarizadas as interpretações do ensaio *in vitro* da formação do biofilme. Foi verificado que a absorvância do meio empregado no teste foi de $0,022 \pm 0,001$, valor ao qual se aplica a premissa de que todas as medições da OD três vezes acima do ponto de corte, isto é, 0,066, revelam uma capacidade das células em aderir a superfície, mesmo sob influência de uma substância com propriedades inibitórias.

Tabela 2 – Classificação do percentual de inibição (\pm erro) de *Pseudomonas aeruginosa* TGC-04 exposta a 2064 µg/mL de cafeína por 48h

Parâmetros	Resultado
Inibição (%)	62,1±0,1
Tipo de adesão das células ao substrato	Moderada
Grau de inibição do biofilme	Moderado
Valor do ponto de corte	0,066±0,001
Presença de células com capacidade de formar biofilme às 48h	Sim

Fonte: Gouveia; Oliveira e Vasconcelos (2023)

DISCUSSÃO

Este trabalho faz parte de um projeto de caracterização da linhagem *P. aeruginosa* TGC-04, isolada de solo contaminado por combustíveis fósseis, em 2014. Ela é dotada de metabolismo hidrocarbonoclástico (CAVALCANTI et al., 2019) e produz uma quantidade significativa de piocianina (ARRUDA et al., 2020), pigmento específico da espécie e com grande potencial biotecnológico (GONÇALVES e VASCONCELOS, 2021). No presente estudo é reportado seu comportamento, em termos da sua motilidade e formação de biofilme, diante a Concentração Mínima Inibitória da cafeína, conhecida num estudo prévio (GOUVEIA et al., 2023). Ressalta-se que embora a cafeína tenha reconhecida sua atividade antimicrobiana (WOZIWODZKA et al., 2022), os resultados foram obtidos de um isolado selvagem de uma das bactérias mais bem adaptadas aos estresses impostos pelo meio, e sendo assim, capaz de persistir em diversos ambientes (FRIMMERSDORF et al., 2010).

Diferentes linhagens de *P. aeruginosa* podem apresentar respostas distintas em relação à motilidade e o meio de cultura utilizado é importante nessa resposta (OTTON et al., 2017). De acordo com Souza et al. (2019), células tipo *swim* apresentam a maior diferenciação entre as linhagens selvagens. Por outro lado, nas motilidades *swarming* e *twitching* são observadas menos variações. Isto vai em acordo ao observado na *P. aeruginosa* TGC-04, linhagem de estudo.

A motilidade *swarming*, coordenada pelos flagelos e *pili*, permite a *P. aeruginosa* mover-se em muitas superfícies (CAIAZZA et al., 2007) e ocorre na ausência de células tipo *swim* e tipo *twitch* (MURRAY et al., 2010). Isto pode justificar os valores da motilidade *swarming* terem sido os maiores na ausência do inibidor. Já o deslocamento *twitching* é coordenado pela extensão e retração do *pili* tipo IV, principal adesina envolvida na fixação de superfícies. Em complemento, ambas as motilidades *swarming* e *twitching* estão envolvidas no desenvolvimento, bem como medeiam a expansão do biofilme (NOLAN et al., 2015).

A cafeína é um bioativo natural que pode agir por diferentes mecanismos, por exemplo, na redução da absorção de ferro (MORCK et al., 1983). Baseado nesse e mais outros mecanismos da cafeína sobre células microbianas, tais como, lise (KABIR et al., 2014) e inibição de sinalização celular (NORIZAN et al., 2013), a partir de nossos resultados podemos levantar algumas hipóteses que deverão ser respondidas em estudos futuros. A primeira hipótese trata da absorção e armazenamento de ferro. Na redução da

biodisponibilidade ou ausência de ferro, tecnicamente causada pela cafeína, *P. aeruginosa* dispõe de meios para controlar a disponibilidade deste importante fator de crescimento bacteriano, como a expressão da proteína fur (do inglês *ferric uptake regulator*) (BERGES et al., 2018). Mesmo que a expressão da proteína fur esteja reprimida, não há alteração do crescimento planctônico, porém a proteína fur é essencial para formação de colônias em meios sólidos (PASQUA et al., 2017).

Na literatura consultada não foi possível identificar um estudo relacionando a cafeína com a proteína fur, desse modo, acreditamos que a redução da biodisponibilidade de ferro promovida pela cafeína reduziu o teor intracelular do metal, comprometendo a corrida das células. No entanto, ressaltamos que o caminho curto realizado pelas células *swarm* de *P. aeruginosa* TGC-04, quando comparado a outros isolados selvagens, pode ser explicado pela relação com a redução da motilidade *twitching*. Outros fatores também podem estar envolvidos, como a concentração de agar e a baixa umidade empregada no teste (OTTON et al., 2017). Isto nos leva à segunda hipótese.

A motilidade *twitching* variou 7 e 9 mm em 24 e 48h, respectivamente, comparadas com o controle. Isto refletiu na formação do biofilme. É sabido que quanto maior for a redução da motilidade *twitching*, menor a capacidade de adesão da célula. Além disso, a alteração das propriedades das adesinas pode aumentar a presença de células tipo *swarm* (MURRAY et al., 2010). A observação de uma densidade óptica acima do ponto de corte quando *P. aeruginosa* TGC-04 estava exposta à cafeína por 48h pode sustentar a hipótese de que o aumento da motilidade *swarming* favoreceu a adesão das células, visto que o ensaio é realizado em espaço confinado e o biofilme é uma estrutura que promove rigidez estrutural e proteção da matriz das agressões externas (THI et al., 2020), neste caso, a cafeína. Adicionalmente, a colonização do biofilme é coordenada por *quorum sensing* e a inibição de homoserina lactonas, principais moléculas sinalizadoras, pode reduzir a produção da matriz polimérica (EPS), o que causa redução da capacidade de adesão e aumento do movimento flagelar (ROY et al., 2018).

Finalmente, a formação de espécies reativas de oxigênio e/ou a cafeína podem alterar a permeabilidade da membrana celular e com isso, dentre outros resultados, pode ocorrer liberação de eATP (ATP endógeno) no meio. Em *P. aeruginosa*, o eATP funciona como sinalizador celular que responde à inibição da motilidade *twitching*, permitindo que o biofilme se desenvolva (NOLAN et al., 2015). Em complemento, outros componentes não densidade celular dependentes como o eDNA (DNA extracelular), liberado com a

lise das células, também é um fator de adesão, desenvolvimento e integridade estrutural de biofilmes em *P. aeruginosa* (PANLILO e RICE, 2021).

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Nas condições empregadas neste estudo, *P. aeruginosa* TGC-04 parece ser uma célula tipo *swarm*. A cafeína promoveu os seguintes achados: redução da motilidade *twitching*, e inalteração das motilidades *swarming* e *swimming*. Quando irradiada, a cafeína atuou na redução da adesão do biofilme, contudo não eliminou a capacidade da linhagem de desenvolver colônia em uma superfície abiótica. Foram levantadas três hipóteses para esses resultados: i) redução do ferro intracelular, forçando as células reduzirem a motilidade do *pilus*; ii) inibição do *quorum sensing* com consequente redução da síntese da matriz polimérica; e iii) a alteração da permeabilidade celular contribuiu para liberação de eATP que regulou negativamente a motilidade *twitching*, refletindo diretamente na adesão de *P. aeruginosa* TGC-04. Mais estudos devem ser conduzidos para confirmar o mecanismo dessa inibição, não descartando o uso da PACT mediada pela cafeína.

REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, A.A.P.; FARAH, A.; SILVA, D.A.M.; NUNAN, E.A.; GLÓRIA, M.B.A. Antibacterial activity of coffee extracts and selected coffee chemical compounds against Enterobacteria. **J Agric Food Chem.** v. 54, n. 23, p. 8738-8743, 2006.
- AROSO, R.T.; CALVETE, M.J.F.; PUCELIK, B.; DUBIN, G.; ARNAUT, L.G.; PEREIRA, M.M.; DABROWSKI, J.M. Photoinactivation of microorganisms with sub-micromolar concentrations of imidazolium metallophthalocyanine salts. **Eur J Med Chem.** v. 184, p. 111740, doi: 10.1016/j.ejmech.2019.111740, 2019.
- ARRUDA, R.R.A.; BONIFÁCIO, T.T.C.; OLIVEIRA, B.T.M.; SILVA, J.E.G.; VASCONCELOS, U. Assessment of indole and pyocyanin in the relationship of *Pseudomonas aeruginosa* and *Escherichia coli*. **Int J Develop Res.** v. 10, n. 3, p. 34122-34128, 2020.
- ASOKAN, G.V.; RAMADHAN, T.; AHMED, E.; SANAD, H. WHO Global Priority Pathogens List: A bibliometric analysis of medline-pubmed for knowledge mobilization to infection prevention and control practices in Bahrain. **Oman Med J.** v. 34, n. 3, p. 184-193, 2019.
- AZIZ, S.A.A.; MAHMOUD, R.; MOHAMED, M.D.E.D. Control of biofilm-producing *Pseudomonas aeruginosa* isolated from dairy farm using Virokill silver nano-based

disinfectant as an alternative approach. **Sci Rep.** v. 12, p. 9452, doi: 10.1038/s41598-022-13619-x, 2022.

BERGES, M.; MICHEL, A-M.; LASSEK, C.; NUSS, A.M.; BECKSTETTE, M.; DERSCH, P.; RIEDEL, K.; SIEVERS, S.; BECHER, D.; OTTO, A.; MAAß, S.; ROHD, M.; ECKWEILER, D.; BORRERO-DE-ACUÑA, J.M.; JAHN, M.; NEUMANN-SCHAAL, M.; JAHN, D. Iron regulation in *Clostridioides difficile*. **Front Microbiol.** v. 9, p. 3183, doi: 10.3389/fmicb.2018.03183, 2018.

CAIAZZA, N.C.; MERRITT, J.H.; BROTHERS, K.M.; O'TOOLE, G.A. Inverse regulation of biofilm formation and swarming motility by *Pseudomonas aeruginosa* PA14. **J Bacteriol.** v. 189, n. 9, p. 3603-3612, 2007.

CARNEIRO, J.E.S.; GERALDINE, R.M.; SILVEIRA, M.F.A.; TORRES, M.C.L.; CARRIM, A.J.I.; SOUZA, A.R.M. Antimicrobial activity and physical properties of biodegradable films added with caffeine and acetic acid. **Braz J Develop.** v. 6, n. 8, p. 60252-60262, 2020.

CAVALCANTI, T.G.; SOUZA, A.F.; FERREIRA, G.F.; DIAS, D.S.B.; SEVERINO, L.S.; MORAIS, J.P.S.; SOUSA, K.A.; VASCONCELOS, U. Use of agro-industrial waste in the removal of phenanthrene and pyrene by microbial consortia in soil. **Waste Biomass Valor.** v. 10, n. 1, p. 205-214, 2019.

CHAKRABORTY, P.; DASTIDAR, D.G.; PAUL, P.; DUTTA, S.; BASU, D.; SHARMA, S.R.; BASU, S.; SARKER, R.K.; SEN, A.; SARKAR, A.; TRIBEDI, P. Inhibition of biofilm formation of *Pseudomonas aeruginosa* by caffeine: a potential approach for sustainable management of biofilm. **Arch Microbial.** v. 202, p. 623-635, 2020.

FRIMMERSDORF, E.; HORATZEK, S.; PELNIKEVICH, A.; WIEHLMANN, L.; SCHOMBURG, D. How *Pseudomonas aeruginosa* adapts to various environments: a metabolomic approach. **Environ Microbiol.** v. 12, n. 6, p. 1734-1747, 2010.

GONÇALVES, T.; VASCONCELOS, U. Colour me blue: The history and the biotechnological potential of pyocyanin. **Molecules.** v. 26, p. 927, doi: 10.3390/molecules26040927, 2021.

GOUVEIA, C.Q.; GOMES, V.T.; TRAVASSOS, R.A.; VASCONCELOS, U. Coffee breaks the journey of pseudomonads: A pause for a reflection. **Mult Sci Rep.** v. 3, n. 2, p. 1-18, doi: 10.54038/ms.v3i2.40, 2023.

JORDAN, A.; GATHERGOOD, N. Designing safer and greener antibiotics. **Antibiotics.** v. 2, n. 3, p. 419-438, 2013.

JURADO-MARTÍN, I.; SAINZ-MEJÍAS, M.; McCLEAN, S. *Pseudomonas aeruginosa*: An audacious pathogen with an adaptable arsenal of virulence factors. **Int J Mol Sci.** v. 22, n. 6, p. 3128, doi: 10.3390/ijms22063128, 2021.

KABIR, F.; KATAYAMA, S.; TANJI, N.; NAKAMURA, S. Antimicrobial effects of chlorogenic acid and related compounds. **J Korean Soc Appl Biol Chem.** v. 57, p. 359-365, 2014.

KANG, C-I.; KIM, S-H.; KIM, H-B.; PARK, S-W.; CHOE, Y-J.; OH, M-D.; KIM, E-C.; CHOE K-W. *Pseudomonas aeruginosa* bacteremia: risk factors for mortality and influence of delayed receipt of effective antimicrobial therapy on clinical outcome. **Clin Infect Dis.** v. 37, n. 6, p. 745-751, 2003.

KHARE, E.; ARORA, N.K. Dual activity of pyocyanin from *Pseudomonas aeruginosa* – antibiotic against phytopathogen and signal molecule for biofilm development by rhizobia. **Can J Microbiol.** v. 57, n. 9, p. 708-713, 2011.

MORCK, T.A.; LYNCH, S.R.; COOK, J.D. Inhibition of food iron absorption by coffee. **Am J Clin Nutr.** v. 37, p. 416-420, 1983.

MURRAY, T.S.; LEDIZET, M.; KAZMIERCZAK, B.I. Swarming motility, secretion of type 3 effectors and biofilm formation phenotypes exhibited within a large cohort of *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates. **J Med Microbiol.** v. 59, p. 511-520, doi: 10.1099/jmm.0.017715-0, 2010.

NOLAN, L.M.; CAVALIERE, R.; TURNBULL, L.; WHITCHURCH, C.B. Extracellular ATP inhibits twitching motility-mediated biofilm expansion by *Pseudomonas aeruginosa*. **BMC Microbiol.** v. 15, p. 55, doi: 10.1186/s12866-015-0392-x, 2015.

NORIZAN, S.N.M., YIN, W-F.; CHAN, K-G. Caffeine as a potential quorum sensing inhibitor. **Sensors.** v. 13, n. 4, p. 5117-5129, 2013.

OTTON, L.M.; CAMPOS, M.S.; MENEGHETTI, K.L.; CORÇÃO, G. Influence of twitching and swarming motilities on biofilm formation in *Pseudomonas* strains. **Arch Microbiol.** v. 199, p. 677-682, doi: 10.1007/s00203-017-1344-7, 2017.

PANDIN, C.; Le COQ, D.; CANETTE, A.; AYMERICH, S.; BRIANDET, R. Should the biofilm mode of life be taken into consideration for microbial biocontrol agents? **Microbial Biotechnol.** v. 10, n. 4, p. 719-734, 2017.

PANLILIO, H.; RICE, C.V. The role of extracellular DNA in the formation, architecture, stability, and treatment of bacterial biofilms. **Biotechnol Bioeng.** v. 118, n. 6, p. 2129-2141, 2021.

PASQUA, M.; VISAGGIO, D.; LO SCIUTO, A.; GENAH, S.; BANIN, E.; VISCA, P.; IMPERIA, F. Ferric uptake regulator fur is conditionally essential in *Pseudomonas aeruginosa*. **J Bacteriol.** v. 199, n. 22, p. e00472-17, doi: 10.1128/JB.00472-17, 2017.

RAMANAVICIENE, A.; MOSTOVOJUS, V.; BACHMATOVA, I.; RAMANAVICIUS, A. Antibacterial effect of caffeine on *Escherichia coli* and *Pseudomonas fluorescens*. **Acta Med Litu.** v. 4, n. 10, p. 185-188, 2003.

RODRIGUES, L.B.; SANTOS, L.R.; TAGLIARI, V.Z.; RIZZO, N.N.; TRENHAGO, G.; OLIVEIRA, A.P.; GOETZ, F.; NASCIMENTO, V.P. Quantification of biofilm production on polystyrene by *Listeria*, *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*

isolated from a poultry slaughterhouse. **Braz J Microbiol.** v. 41, n. 4, p. 1082-1085, 2010.

ROSSI, C.; SERIO, A.; LÓPEZ, C.C.; ANNIBALLI, F.; AURICCHIO, B.; GOFFREDO, E.; GOGA, B.T.C.; LISTA, F.; FILLO, S.; PAPARELLA, A. Biofilm formation, pigment production and motility in *Pseudomonas* spp. isolated from the dairy industry. **Food Control.** v. 86, p. 241-248, 2018.

ROY, R.; TIWARI, M.; DONELLI, G.; TIWARI, V. Strategies for combating bacterial biofilms: A focus on anti-biofilm agents and their mechanisms of action. **Virulence.** v. 9, n. 1, p. 522-554, 2018.

SHAO, X.; XIE, Y.; ZHANG, Y.; LIU, J.; DING, Y.; WU, M.; WANG, X.; DENG, X. Novel therapeutic strategies for treating *Pseudomonas aeruginosa* infection. **Expert Opin Drug Discov.** v. 15, p. 1403–1423, doi: 10.1080/17460441.2020.1803274, 2020.

SOUSA, T.; HÉBRAUD, M.; DAPKEVICIUS, M.L.N.E.; MALTEZ, L., PEREIRA, J.E.; CAPITA, R.; ALONSO-CALLEJA, C.; IGREJAS, G.; POETA, P. Genomic and metabolic characteristics of the pathogenicity in *Pseudomonas aeruginosa*. **Int J Mol Sci.** v. 2021, n. 22, p. 12892, doi: 10.3390/ijms222312892, 2021.

SOUZA, I.A.; GARCIA, D.O.; ANVERSA, L.; KATSUKO, R.; KOBAYASHI, T.; NAKAZATO, G.; SAEKI, E.K. Comparative analysis of the virulence factors in *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from clinical and environment. **Colloq Vitae.** v. 11, n. 3, p. 41-50, 2019.

THI, M.T.T.; WIBOWO, D.; REHM, B.H.A. *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. **Int J Mol Sci.** v. 21, n. 22, p. 8671, doi: 10.3390/ijms21228671, 2020.

WOZIWODZKA, A.; KRYCHOWIAK-MAŚNICKA, M.; GOŁUŃSKI, G.; ŁOSIEWSKA, A.; BOROWIK, A.; WYRZYKOWSKI, D.; PIOSIK, J. New life of an old drug: Caffeine as a modulator of antibacterial activity of commonly used antibiotics. **Pharmaceuticals.** v. 15, n. 7, p. 872, doi: 10.3390/ph15070872, 2022.

WU, T.; XU, J.; XIE, W.; YAO, Z.; YANG, H.; SUN, C.; LI, X. *Pseudomonas aeruginosa* L10: A hydrocarbon-degrading, biosurfactant-producing, and plant growth-promoting endophytic bacterium isolated from a reed (*Phragmites australis*). **Front Microbiol.** v. 9, p. 1087, doi:10.3389/fmicb.2018.01087, 2018.