



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Thais Moraes Barin

**ATIVIDADE ANTIMICROBIANA, SINÉRGICA E ANTIBIOFILME DE
SILDENAFIL FRENTE A *Pseudomonas aeruginosa***

Santa Maria, RS

2021

Thais de Moraes Barin

**ATIVIDADE ANTIMICROBIANA, SINÉRGICA E ANTIBIOFILME DE SILDENAFIL
FRENTE A *Pseudomonas aeruginosa*.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM-RS), como requisito para a obtenção do título de **Mestre em Ciências Farmacêuticas**.

Orientador: Prof. Dr. Roberto Christ Vianna Santos

Co-orientadora: Dr^a. Camilla Filippi dos Santos Alves

Santa Maria, RS

2021

BARIN, THAIS DE MORAES BARIN
ATIVIDADE ANTIMICROBIANA, SINÉRGICA E ANTIBIOFILME DE
SILDENAFIL FRENTE A Pseudomonas aeruginosa / THAIS DE
MORAES BARIN BARIN.- 2021.
60 p.; 30 cm

Orientador: Roberto Christ Vianna Santos
Coorientadora: Camilla Filippi dos Santos Alves
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Maria, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós
Graduação em Ciências Farmacêuticas, RS, 2021

1. Reposicionamento 2. Citrato de Sildenafil 3.
Pseudomonas aeruginosa 4. Resistência antimicrobiana 5.
Biofilme I. , Roberto Christ Vianna Santos II. , Camilla
Filippi dos Santos Alves III. Título.

Sistema de geração automática de ficha catalográfica da UFSM. Dados fornecidos pelo autor(a). Sob supervisão da Direção da Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central. Bibliotecária responsável Paula Schoenfeldt Patta CRB 10/1728.

Declaro, THAIS DE MORAES BARIN BARIN, para os devidos fins e sob as penas da lei, que a pesquisa constante neste trabalho de conclusão de curso (Dissertação) foi por mim elaborada e que as informações necessárias objeto de consulta em literatura e outras fontes estão devidamente referenciadas. Declaro, ainda, que este trabalho ou parte dele não foi apresentado anteriormente para obtenção de qualquer outro grau acadêmico, estando ciente de que a inveracidade da presente declaração poderá resultar na anulação da titulação pela Universidade, entre outras consequências legais.

Thais Moraes Barin

ATIVIDADE ANTIMICROBIANA, SINÉRGICA E ANTIBIOFILME DE SILDENAFIL
FRENTE A PSEUDOMONAS AERUGINOSA

Dissertação apresentada ao Programa
de Pós-Graduação em Ciências
Farmacêuticas da Universidade
Federal de Santa Maria (UFSM-RS),
como requisito para a obtenção do
título de **Mestre em Ciências
Farmacêuticas**.

Aprovado em 29 de março de 2021

M.M.

Roberto Christ Vianna Santos, Dr. (UFSM)
(Orientador)

Camilla Filippa dos Santos Alves

Camilla Filippi dos Santos Alves, Dra. (UFSM)
(Co-orientadora)

Taiame Schneider

Taiame Schneider, Dra. (URI) – Parecer

Pauline Cordenonsi Bónez

Pauline Cordenonsi Bónez, Dra. (URI) - Parecer

Santa Maria, RS
2021

DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho à minha mãe Sônia Mar de Moraes Barin (*In memoriam*), a qual sempre foi meu exemplo de vida, força e dedicação.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por sempre colocar pessoas maravilhosas em meu caminho, pela minha vida, pela minha saúde e determinação.

A minha mãe e minhas avós (*In memoriam*), que com certeza onde estiverem me deram forças para continuar. Ao meu irmão e ao meu pai, por sempre me apoiarem e me darem forças para seguir em frente.

Ao meu companheiro de vida Lério Aita Júnior, por nunca ter me deixado desistir dos meus sonhos, me apoiar, pelo companheirismo, sempre estar ao meu lado crescendo juntos e a sua família pelo apoio em todos os momentos.

A minha coorientadora e amiga Dra. Camilla Filippi dos Santos Alves, que com certeza sem a sua ajuda eu não teria concluído todos os testes, minha monografia e por sempre me ajudar no foco para não desistir.

A todos os colegas do Laboratório de Pesquisa de Microbiologia Oral (LAPEMICRO/UFSM), pelo companheirismo de sempre, ensinamentos e paciência.

Ao Professor Dr. Roberto Christ Vianna Santos, que me proporcionou a oportunidade de conquistar um dos meus maiores sonhos em ser mestre.

Grata a todos que estiveram presentes em minha vida, que mesmo de longe observaram a minha luta diária em conciliar o trabalho e o estudo em um momento tão delicado que vivemos no ano de 2020 e 2021.

Obrigada à Universidade Federal de Santa Maria, ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas: Análises Clínicas e Toxicológicas, pela oportunidade de cursar o mestrado.

“Superar é preciso.
Seguir em frente é essencial.
Olhar para trás é perda de tempo.
Passado se fosse bom era presente”.

(Clarice Lispector)

RESUMO

ATIVIDADE ANTIMICROBIANA, SINÉRGICA E ANTIBIOFILME DE SILDENAFIL FRENTE A *Pseudomonas aeruginosa*

AUTOR: Thais de Moraes Barin

ORIENTADOR: Prof. Dr. Roberto Christ Vianna Santos

CO-ORIENTADORA: Dr^a. Camilla Filippi dos Santos Alves

O aumento da resistência antimicrobiana tem tornado cada vez mais escasso o arsenal terapêutico contra infecções bacterianas, gerando um grave problema de saúde pública, especialmente no ambiente hospitalar. Nesse contexto, sobressaem-se as graves infecções causadas por *P. aeruginosa*, as quais incluem pneumonia, infecções sanguíneas, bem como infecções associadas ao uso de dispositivos médicos pela formação de biofilmes. Desse modo, têm-se buscado novas alternativas terapêuticas frente à ascensão de bactérias resistentes e causadoras de infecções persistentes. Nesse sentido, o reposicionamento de fármacos desponta como uma possível ferramenta para a descoberta de novos compostos com ação antimicrobiana. O fármaco Citrato de Sildenafil, conhecido comumente como Viagra[®], atualmente é utilizado para o tratamento da hipertensão pulmonar. Nesse contexto, o presente trabalho teve como objetivo avaliar atividade antimicrobiana, antibiofilme e sinérgica do Citrato de Sildenafil frente a *P. aeruginosa*. A atividade antimicrobiana foi avaliada através de microdiluição em caldo e evidenciou que o Citrato de Sildenafil, foi capaz sendo capaz de inibir o crescimento bacteriano. A ação antibiofilme foi avaliada em placas de poliestireno por meio da técnica de cristal violeta e também através de Microscopia de Força Atômica (MFA). O fármaco demonstrou ser capaz de inibir e destruir o biofilme reduzindo a biomassa total em 87,17% a 83,81%, respectivamente. A microscopia de força atômica indicou a ação positiva do Sildenafil tanto na destruição quanto na inibição do biofilme. O ensaio de associação do Sildenafil com os antimicrobianos Cloridrato de Cefepima[®], Imipenem[®] Monoidratado e Cilastatina Sódica e Sulfato de Polimixina B[®], demonstraram efeito potencializador, resultando em um efeito sinérgico. Desse modo, os resultados satisfatórios encontrados neste estudo apontam um novo uso terapêutico para o fármaco Citrato de Sildenafil, tornando-se uma alternativa promissora para o tratamento de infecções causadas pelo patógeno *P. aeruginosa*.

Palavras-chave: Reposicionamento. Citrato de Sildenafil. *Pseudomonas aeruginosa*. Resistência antimicrobiana. Biofilme.

ABSTRACT

ANTIMICROBIAL, SYNERGIC AND ANTIBIOFILM ACTIVITY OF SILDENAFIL IN FRONT OF *Pseudomonas aeruginosa*

AUTHOR: Thais de Moraes Barin
ADVISOR: Prof^o. Dr. Roberto Christ Vianna Santos
CO-SUPERVISOR: Dr^a. Camilla Filippi dos Santos Alves

The increase in antimicrobial resistance has made the therapeutic armamentarium against bacterial infections increasingly scarce, generating a serious public health problem, especially in the hospital environment. In this context, serious infections caused by *P. aeruginosa* stand out, which include pneumonia, bloodstream infections, as well as infections associated with the use of medical devices due to the formation of biofilms. Thus, new therapeutic alternatives have been sought against the rise of resistant bacteria that cause persistent infections. In this sense, the repositioning of drugs emerges as a possible tool for the discovery of new compounds with antimicrobial action. The drug Sildenafil Citrate, commonly known as Viagra®, is currently used for the treatment of pulmonary hypertension. In this context, this study aimed to evaluate the antimicrobial, antibiofilm and synergistic activities of Sildenafil Citrate against *P. aeruginosa*. The antimicrobial activity was evaluated by microdilution in broth and showed that Sildenafil Citrate was capable of inhibiting bacterial growth. The antibiofilm action was evaluated on polystyrene plates using the crystal violet technique and also through Force Microscopy Atomic (MFA). The drug has been shown to be able to inhibit and destroy the biofilm, reducing total biomass by 87.17% to 83.81%, respectively. Atomic force microscopy indicated the positive action of Sildenafil in both destruction and inhibition of the biofilm. The trial of association of Sildenafil with the antimicrobials Cefepime Hydrochloride®, Imipenem® Monohydrate and Sodium Cilastatin and Polymyxin B® Sulfate, demonstrated a potentiating effect, resulting in a synergistic effect. Thus, the satisfactory results found in this study point to a new therapeutic use for the drug Sildenafil Citrate, making it a promising alternative for the treatment of infections caused by the pathogen *P. aeruginosa*.

Keywords: Repositioning. Sildenafil citrate. *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrobial resistance. Biofilm.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura química do Citrato de Sildenafil (Viagra®).....	17
Figura 2 - Esquema que demonstra o mecanismo de ação do Citrato de Sildenafil em HAP	18
Figura 3 - Esquema do mecanismo de ação dos inibidores da PDE5.....	19
Figura 4 - Imagem de um biofilme de <i>P. aeruginosa</i> formado, mostra a produção de Substâncias Poliméricas Extracelulares (SPE) e o envolvimento das células bacterianas em meio a matriz produzida.....	25
Figura 5 - Ilustração das etapas da formação de biofilmes.	26
Figura 6- Perfil de formação de biofilme dos isolados clínicos de <i>P.aeruginosa</i> , em incubação, 24 e 48h respectivamente.....	39
Figura 7 - Gráficos do resultado da inibição da formação do biofilme de <i>P. aeruginosa</i> , onde cada gráfico demonstra o resultado de um IC específico, Gráficos 3A (4PAUR), 3B (6PAST), 3C (7PAES), 3D (8PAUR), 3E (9PAUR), 3F (10PAUR) e 3G (PA01).	39
Figura 8 - Gráficos do resultado da destruição da formação do biofilme de <i>P. aeruginosa</i> , onde cada gráfico demonstra o resultado de um IC específico, Gráficos 4A (1PAUR), 4B (2PAHC), 4C (3PAUR), 4D (4PAUR), 4E (5PAES), 4F (6PAST), 4G (7PAES), 4H (8PAUR), 4I (9PAUR), 4J, (10PAUR) e 4K (PA01).....	41
Figura 9 - Imagens que demonstram a inibição do biofilme de <i>P. aeruginosa</i> frente ao fármaco Citrato de Sildenafil por meio da MFA.	42
Figura 10 - Imagens que demonstram a destruição do biofilme de <i>P. aeruginosa</i> frente ao fármaco Citrato de Sildenafil por meio da MFA.	42

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Isolados Clínicos de <i>P. aeruginosa</i> , seus respectivos locais de coleta e as siglas.	33
Tabela 2 - Resultados dos valores de Índice de concentração inibitória fracionada (ICIF) às diferentes interações.	37
Tabela 3 - Resultados da PA01 e dos IC da Concentração Inibitória Mínima e da Concentração Bactericida Mínima (CBM).	38
Tabela 4 - Avaliação do sinergismo entre os fármacos Polimixina B e Citrato de Sildenafil, Citrato de Sildenafil e Cefepima e Citrato de Sildenafil e Imipenem frente o IC 7PAES.	43
Tabela 5 - Avaliação do sinergismo entre os fármacos Citrato de Sildenafil e Polimixina B, Citrato de Sildenafil e Cefepime, Citrato de Sildenafil e Imipenem frente a PA01.	44

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária
CCIH - Comissões de Controle de Infecção Hospitalar
CS – Citrato de Sildenafil
CIM - Concentração Inibitória Mínima
DE – Disfunção Erétil
EMA - European Medicines Agency
FC - Fibrose Cística
FDA - *Food and Drugs Administration*
GMPc - Monofosfato De Guanosina Cíclico
GTP - Guanosina Trifosfato
HAP - Hipertensão Pulmonar
HAPI - Hipertensão Arterial Pulmonar Idiopática
HPB - Hiperplasia Prostática Benigna
IPM - Imipenem
PPGCF - Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas
NO - Óxido Nítrico
OMS - Organização Mundial de Saúde
PDE5 - fosfodiesterase 5
PKG - Proteína Quinase G
STUI - Sintomas do Trato Urinário Inferior
UK – Sandwich
UFSM - Universidade Federal de Santa Maria
UTI's - Unidades de Terapia Intensiva

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
2 OBJETIVOS	16
2.1 OBJETIVO GERAL	16
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	16
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	17
3.1 CITRATO DE SILDENAFIL	17
3.2 REPOSICIONAMENTO DE FÁRMACOS	20
3.3 RESISTÊNCIA MICROBIANA.....	21
3.4 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	23
3.5 BIOFILME.....	25
3.5.1 ESTRATÉGIAS CONTRA O BIOFILME	27
4 Manuscrito	29
5 Discussão	50
6 Conclusão	53
REFERÊNCIAS	54

1 INTRODUÇÃO

Com a utilização indiscriminada de antimicrobianos, um cenário que vem à tona, é o aumento de cepas microbianas resistentes aos medicamentos já existentes no mercado. Como uma das ameaças à saúde pública, estima-se que esta resistência ocasione cerca de 700 mil mortes por ano, seja em países subdesenvolvidos quanto em países desenvolvidos. Esta resistência microbiana é gerada através de mutações genéticas, causadas por medicamentos aplicados de forma incorreta, tornando ineficaz para o tratamento desejado. Estima-se que até 2050, ocorra cerca de 10 milhões de óbitos por causa da resistência antimicrobiana, gerando um quadro cada vez mais preocupante, pois o número é mais significativo que o de mortes ocasionadas por câncer (ESTRELA, 2018; SANTOS, 2004)

Segundo dados da Organização Mundial de Saúde (OMS) em 2012 as infecções já eram responsáveis por 25% das mortes no mundo, sendo 45% destas ocasionadas em países de menor desenvolvimento. Um outro panorama que deve ser observado é que os antimicrobianos correspondem a 12% das prescrições médicas realizadas em ambulatório, sendo assim considerada a segunda classe de fármacos mais utilizada o que gera em torno de 20 a 50% das despesas hospitalares em medicações.

Além do mais, existe uma formação de um conjunto de microrganismos, ao qual forma um complexo em uma matriz contendo um polímero orgânico que se aderem a uma superfície, podendo ser um processo reversível ou irreversível, denominado biofilme. Esse, pode ser formado por populações a partir de uma ou diversas espécies, sendo que para as bactérias esta adesão se torna um mecanismo de sobrevivência. Em indústrias, principalmente a de alimentos, a formação do biofilme microbiano ocorre em equipamentos e utensílios que são utilizados, resultando grandes problemas, pois gera uma fonte de contaminação, comprometendo a qualidade do produto e conseqüentemente a saúde de quem faz a ingestão desse alimento (MILLEZI et al., 2012). Essa capacidade dos microrganismos que o compõem ao aderir e colonizar as superfícies, ocorrem também em materiais médicos invasivos utilizados, como exemplo próteses e cateteres, ocasionando graves problemas de saúde (CAIXETA et al., 2012).

Com a formação dos biofilmes, ocorre uma resistência maior e frequentemente estão associados às altas taxas de infecções. Em 80% das infecções há o envolvimento da formação do biofilme, assim causando uma maior taxa de morbidade e mortalidade, quando comparado a infecções causadas por microrganismos não formadores de biofilme. Um dos microrganismos potenciais formadores de biofilme é a bactéria *P. aeruginosa*, que tem como característica ser um bacilo gram-negativo, capaz de crescer em condições aeróbias, sendo que geralmente o seu habitat preferencial é a água. Pode também ser encontrado no solo e em outros ambientes. Patógeno de origem oportunista, que causa infecções em pacientes pós-operatórios, leva a formação de escaras e além disso pode afetar pacientes com um sistema imunológico saudável (BOGINO et al., 2013).

A sua resistência natural é associada a um grande número de antimicrobianos e antissépticos, e, com isso, tornou-se uma das principais causadoras de infecções hospitalares fazendo com que o seu tratamento esteja entre os principais a serem realizados (EKINS et al., 2011). No entanto, devido ao uso indiscriminado de antimicrobianos convencionais e em função da alta capacidade de formação de biofilmes e esses possuírem uma estrutura complexa, na maioria das vezes o uso de antimicrobianos não é completamente efetivo. Além disso, os antimicrobianos usados contra os biofilmes não apresentam resultados confiáveis através dos testes de suscetibilidade específicos, o que conseqüentemente ocasiona falhas no tratamento, portanto podendo ocasionar novas infecções (HØIBY et al., 2014).

Nesse contexto, a reutilização de fármacos pode ser uma alternativa promissora. Trata-se de um processo que consiste na identificação e na pesquisa de novas indicações terapêuticas para fármacos já existentes para o uso. Gira em torno de uma possibilidade que requer menos tempo e menos etapas para o seu desenvolvimento, já que o perfil do medicamento já é conhecido e o investimento torna-se assim menos oneroso. (XUE et al., 2018).

O uso do Citrato de Sildenafil tem sido amplamente utilizado em alguns processos patológicos, como em casos de cicatrizações de feridas, lesões ocasionadas nos pulmões (CADIRCI et al., 2011), como também hepáticas e renais (GOKAKIN et al., 2013) e no tratamento da hipertensão arterial pulmonar, entre outras (HEMNES; ZAIMAN; CHAMPION, 2008). Em todas essas patologias o Citrato

de Sildenafil tem obtido resultados satisfatórios reduzindo o processo inflamatório e o estresse oxidativo, assim consequentemente diminuindo o dano tecidual.

Diante disso, o Citrato de sildenafil é certamente um clássico exemplo de reposicionamento farmacológico, pois foi inicialmente estudado para o tratamento de *angina pectoris* e atualmente é o primeiro fármaco utilizado via oral no tratamento da disfunção erétil, sendo utilizado também no tratamento da Hipertensão Arterial Pulmonar Idiopática (HAPI) e seu uso terapêutico abrange crianças, adultos e idosos. Existem outros medicamentos que também foram reutilizados, como por exemplo a Talidomida que é conhecido e desenvolvido para atuar como sedativo e hoje é empregada nos tratamentos de lúpus eritematoso sistêmico e mieloma múltiplo (DUARTE et. al., 2005).

Existe um número crescente de relatos de casos sobre o uso do Citrato de Sildenafil oral no tratamento de diversas doenças. Foram realizados estudos para comparar os efeitos agudos de Citrato de Sildenafil, óxido nítrico e epoprostenol. Foi verificado que o CS pode aumentar a eficácia de cada uma delas, permitindo a redução de suas doses ou o espaçamento de seus intervalos (GHOFRANI et al., 2003). Além disso, surgem estudos que relatam propriedades antimicrobianas deste fármaco, ao qual mostram uma diminuição na incidência de casos de infecções em pacientes que fazem seu uso. Entretanto, são raros os estudos e o esperado seriam estudos com inclusão de maior número de pacientes e com tempo de seguimento maior, para que se possa conhecer os resultados a longo prazo e para que se chegue a uma definição das doses e dos intervalos de administração ideais (MOLINA et al., 2003).

Desta maneira, o presente estudo visa verificar a importância dos novos usos de medicamentos e novas estratégias para combater e prevenir a ação microbiana, assim retardando/inibindo a formação do biofilme ou até mesmo o eliminando. Para que isso ocorra de forma rápida, estudos devem ser mais aprofundados com o reposicionamento de fármacos, pois esta reutilização gera uma diminuição nos custos e um menor tempo para a sua utilização no tratamento de pacientes que necessitam. Como o uso do Citrato de Sildenafil apresentou ser positivo em diversos estudos, para diversas patologias, viu-se com isso aprofundar os estudos para obter uma nova estratégia em seu reposicionamento.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a atividade antimicrobiana e antibiofilme do Citrato de Sildenafil, bem como detectar possíveis efeitos sinérgicos a partir da sua combinação com agentes antimicrobianos clássicos utilizados na prática clínica.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

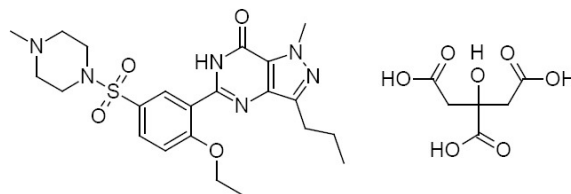
- Determinar a Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM) do Citrato de Sildenafil frente a isolados clínicos de *P. aeruginosa*;
- Avaliar a capacidade do Citrato de Sildenafil em inibir ou destruir biofilmes formados por *P. aeruginosa*.
- Quantificar o efeito de combinações de fármacos, Cloridrato de Cefepima[®], Imipenem[®] Monoidratado e Cilastatina Sódica e Sulfato de Polimixina B[®], e o Citrato de Sildenafil em crescimento *in vitro*.
- Analisar os efeitos do Citrato de Sildenafil sobre a estrutura tridimensional dos biofilmes formados por *P. aeruginosa*.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 CITRATO DE SILDENAFIL

O Citrato de Sildenafil é quimicamente conhecido 5- [2-etoxi-5- (4-metilpiperazina-1-sulfonil) fenil] -1-metil-3-propil-1,6-di-hidro-7H-pirazol [4,3-d]] citrato de pirimidin-7-ona, como ilustrado na figura 1. Após longos anos de estudos e o FDA (*Food and Drugs Administration*) nos Estados Unidos, aprovou a venda do mesmo em 1998, tornando-se o primeiro medicamento de uso oral aprovado para o tratamento da disfunção erétil (TORRES, 2012).

Figura 1 - Estrutura química do Citrato de Sildenafil (Viagra[®])

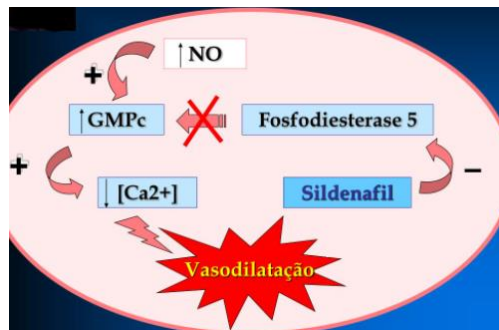


Fonte: (LOS WEINERT; PEZZA; PEZZA, 2008)

Diante disso, o Citrato de Sildenafil se tornou um dos ativos mais populares e amplamente utilizados, tendo em vista que a disfunção erétil acomete aproximadamente 150 milhões de homens em todo mundo. Além disso, este fármaco é bastante conhecido pelos seus efeitos benéficos para hipertensão pulmonar e em pacientes com insuficiência cardíaca, podendo ser utilizado por via oral (WANNMACHER, 2004). A Hipertensão Pulmonar (HAP) é uma doença vascular agressiva e com baixa expectativa de vida. O mecanismo de ação do CS atenua nos sinais e sintomas da doença por aumentar o suprimento sanguíneo aos pulmões. A pressão sistólica, a hipertrofia ventricular e a muscularização das artérias pulmonares são reduzidas após o esquema terapêutico (RUBIN et al., 2011).

A eficácia no tratamento da HAP, se dá pelo fato de que o cloridrato de Sildenafil ser um potente inibidor seletivo da fosfodiesterase 5 (PDE5) específica para o monofosfato de guanósina cíclico (GMPc), ao qual é abundante nos pulmões (MICHELAKIS et al., 2003). A inibição da PDE5 impede a degradação de GMPc, que é um mensageiro intracelular do óxido nítrico, com consequente vasodilatação pulmonar, fazendo com que haja um aumento da sobrevida dos pacientes (Figura 2) (OLIVEIRA; FARIA & AMARAL, 2005).

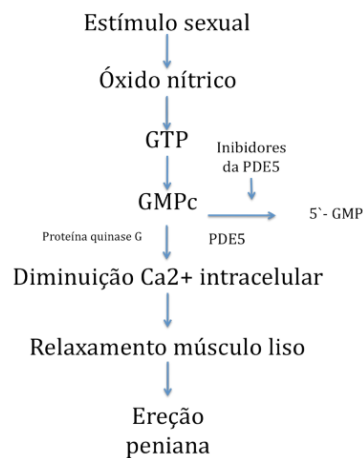
Figura 2 - Esquema que demonstra o mecanismo de ação do Citrato de Sildenafil em HAP



Fonte: (MARGOTTO, 2004)

Quanto ao mecanismo fisiológico da ereção peniana, em condições normais ocorre a liberação de óxido nítrico (NO) quando sob estímulo sexual. As terminações nervosas do tecido peniano secretam o NO secretado, assim como pelas células endoteliais irá ativar a enzima que converte a guanósina trifosfato (GTP) em guanósina monofosfato cíclico, que por sua vez irá estimular a proteína quinase G (PKG), a qual iniciará a cascata de fosforilação protéica (STEERS et al., 2001). A ativação da cascata de fosforilação protéica resulta na diminuição do nível dos íons de cálcio intracelular, levando a uma dilatação das artérias que irrigam o pênis, relaxamento do músculo liso do corpo cavernoso e consequentemente a ereção. Os inibidores da PDE5 se assemelham estruturalmente a base guanósina do GMPc, ocupando o sítio ativo da enzima, prevenindo a hidrólise desse segundo mensageiro e dessa forma contribuindo para o aumento dos efeitos vasodilatadores do NO (SOCAŁA et al., 2017; WRIGHT, 2006) .

Figura 3 - Esquema do mecanismo de ação dos inibidores da PDE5



Fonte: Adaptado (WRIGHT, 2006)

O uso do Citrato de Sildenafil foi aprovado pela FDA no ano de 1998, sendo um ano depois lançado no Brasil e aprovado pela “European Medicines Agency” (EMA) no ano de 2003. Encontra-se no mercado nas concentrações de 20, 25, 50 e 100 mg. Segundo a *United States Pharmacopeia*, sua dosagem adequada é de 25mg e é administrado por via oral cerca de 30 minutos a 1 hora antes da relação sexual, tendo uma duração do seu efeito de 4 a 5 horas. Existem também dosagens de 50mg e 100mg, no entanto, a sua dosagem não pode ser superior a 100mg diários, o que acarretaria em uma superdosagem e conseqüentemente efeitos físicos, sendo esse valor superior considerado uma dosagem tóxica (BUNACIU; NASHAR; ENEIN, 2011).

Geralmente, a dose indicada é de 50mg, podendo assim elevar ou diminuir a dosagem conforme recomendado a cada paciente, no caso de superdosagem, medidas devem ser adotadas, conforme necessário. Segundo a lista de medicamentos de referência, publicada periodicamente pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), são definidos como medicamentos referência: o Revatio® para a menor concentração e o Viagra® para as demais concentrações (BRASIL, 2014).

Embora mantenha um excelente nível de segurança e perfil de tolerabilidade, poucos estudos avaliaram os possíveis efeitos indesejáveis do tratamento crônico

com o Citrato de Sildenafil sobre o sistema reprodutor masculino, especialmente na próstata visando o relaxamento da uretra e alívio dos STUI. Em estudos foram observados que o tratamento com Citrato de Sildenafil não induziu danos evidentes na próstata, porém mostrou eficácia terapêutica em doenças inflamatórias crônicas. Entre elas, uma atenção especial tem sido dada para as patologias relacionadas ao trato urogenital masculino, como a Hiperplasia Prostática Benigna (HPB), Câncer de próstata e Prostatites (BELLA; DEYOUNG & BROCK, 2007).

3.2 REPOSICIONAMENTO DE FÁRMACOS

Utilizado como estratégia terapêutica há muitos anos, o reposicionamento de fármacos consiste na aplicação de reuso para fármacos já empregados na prática clínica. O mesmo método pode ser desenvolvido com moléculas em fase de desenvolvimento do medicamento que não mostraram eficácia para uma determinada patologia ou ainda que estiveram em investigação, mas que já possuam um perfil de segurança demonstrado em ensaios. Todavia, para se beneficiar deste reuso, é extremamente necessário a realização de diversos ensaios clínicos, sendo que a reutilização de medicamentos já comercializados resulta em uma razoável diminuição dos custos para o tratamento de diversas enfermidades (BRECKENRIDGE & JACOB, 2018).

A produção de um medicamento seguro, não ocorre na mesma velocidade em que surgem novas patologias. Atualmente, o acelerado advento de doenças modernas, bem como o aumento da resistência microbiana aos fármacos disponíveis, coloca a ciência em estado de alerta. Diante disso, o reposicionamento de fármacos é uma alternativa de grande atrativo, tendo em vista, que o desenvolvimento de um novo medicamento pode levar entre 10 a 15 anos, incluindo a descoberta da nova molécula e a sua síntese, a fase pré-clínica (testes *in vitro* e em animais, para avaliar a farmacocinética, farmacodinâmica, segurança e toxicidade do fármaco), os ensaios clínicos (fase I, II e III) e a farmacovigilância pós comercialização (fase IV) (POLAMREDDY, P.; GATTU, N, 2018). Por isso, novas terapias foram introduzidas para que o tratamento de determinadas doenças pudesse ser induzido, como pelos processos de modificação molecular de compostos já existentes, reposicionamento de fármacos, associação de fármacos, entre outros (TEMPONE et al., 2011).

O Citrato de Sildenafil é um clássico exemplo de reposicionamento farmacológico, pois foi aprovado para o tratamento de angina e atualmente é utilizado para mitigar a disfunção erétil e HAPI. Outros medicamentos também compõem a lista de reutilização, como é o caso da Talidomida, que a princípio foi desenvolvido como sedativo e hoje é empregada nos tratamentos dos lúpus eritematoso sistêmico e mieloma múltiplo. O milnacipran, que foi desenvolvido como um fármaco antidepressivo e após aprovado para o tratamento da fibromialgia. Outro exemplo inclui o plerixafor, que foi estudado primeiramente como um inibidor do vírus HIV, e posteriormente lançado como um mobilizador de células-tronco hematopoiéticas no tratamento de mieloma múltiplo (DUARTE et al., 2005). Estima-se assim que a pesquisa dos novos alvos farmacológicos demore entre 10 a 15 anos e o processo de desenvolvimento do medicamento reposicionado seja menor pelo conhecimento do perfil do medicamento já ser conhecido, além do investimento na pesquisa seja menor (XUE, H. et al., 2018).

Ainda neste contexto, um dos cenários que mais preocupam os profissionais da saúde, é o rápido aumento do número de cepas microbianas resistentes aos fármacos disponíveis. A OMS, estipula que para a produção de um novo antimicrobiano, esse deve possuir uma ação eficaz com uma única dose ou em doses menores, um custo reduzido, uma diminuição dos efeitos indesejáveis, que o paciente não necessite de internação para o tratamento e que não ocorra nenhum tipo de indução a resistência microbiana. Entretanto, sabe-se que a realidade está fora desta prática perfeita e conhecendo as limitações de administração de um fármaco, a pesquisa e o desenvolvimento de modernos medicamentos parecem estar distantes de surgirem (EKINS et al., 2011). Com isso, diversos grupos de pesquisa, buscam alternativa no tratamento de infecções utilizando moléculas e/ou fármacos empregados para outros fins.

3.3 RESISTÊNCIA MICROBIANA

Os microrganismos dispõem da capacidade de adquirir resistência aos fármacos utilizados na prática clínica, ou seja, os tratamentos disponíveis para as principais infecções, tornam-se ineficazes à medida que o microrganismo adquire informação genética que resultam em mecanismos de resistência, como por exemplo, a produção de enzimas, alteração da permeabilidade, bombas de efluxo e

redução do número ou afinidade aos sítios de ligação dos fármacos. O surgimento desses mecanismos de resistência, são decorrentes da utilização inadequada de antimicrobianos, tais como, prescrição desnecessária, automedicação e interrupção precoce do tratamento (WOOLHOUSE & FARRAR, 2014; SINGH et al., 2017).

Além de constituir um enorme ônus financeiro aos serviços de saúde, a resistência antimicrobiana é responsável por milhares de mortes por infecções persistentes (OMS, 2012). Estima-se que mundialmente, ocorra 700.000 mil mortes associadas à resistência antimicrobiana, com a perspectiva de se chegar ao número de 10 milhões até o ano de 2050, se nenhuma medida for tomada (O'NEILL, 2016). Os antimicrobianos, são as alternativas de tratamento para essas infecções, eles fazem parte de um grande grupo de medicamentos com estrutura diversa e múltiplos mecanismos de ação contra bactérias, vírus, fungos e parasitas. Entre os anos de 1983 e 1992, trinta novos antimicrobianos foram aprovados pelo FDA, enquanto que entre os anos de 2003 e 2012, foram apenas sete (WOOLHOUSE & FARRAR, 2014).

As altas taxas de letalidade relacionadas com infecções hospitalares, varia muito em relação a doença de base, etiologia, foco da doença, entre outros. Diante disso, no Brasil, os hospitais contam com a criação das Comissões de Controle de Infecção Hospitalar (CCIH), onde uma equipe de médicos, farmacêuticos e enfermeiros, monitoram e desenvolvem ações visando prevenir ou reduzir a incidência ou a gravidade das infecções nosocomiais. Estas informações estão relacionadas com eventos preventivos, fazendo com que haja uma melhor qualidade no serviço de saúde (WANNMACHER, 2004). Por isso, a identificação correta do patógeno que está sendo verificado deve ser levado em conta, para que a escolha do fármaco antimicrobiana não seja prescrita erroneamente (BOGINO et al., 2013)

Apesar de todo esse controle, na maioria dos hospitais ainda há um grande número de prescrições de antimicrobianos para os pacientes, sendo considerada a segunda classe de fármaco mais utilizada, gerando assim uma despesa de grande valor. Também é utilizado em grande escala em atendimentos ambulatoriais, aos quais pacientes relatam seus sintomas e já saem com a prescrição médica do antimicrobiano sem a realização de exames para confirmação. Esta ampla utilização começa a afetar de forma significativa não somente a microbiota e imunidade deste

paciente, mas também dos outros pacientes (JACKSON et al., 2009). Por isso, iniciar um tratamento com um antimicrobiano somente pode ser feita por meio de dados clínicos característicos de uma infecção como picos febris, presença de secreção ou tosse com escarro produtivo, através da realização de exames laboratoriais e também associado com exames de imagem. Após a realização dos testes a suspeita clínica pode ou não ser confirmada, mas com a comprovação da existência da infecção e o sítio de infecção, auxiliará na escolha do antimicrobiano ideal (MOTA et al., 2010).

Apesar de que todos os microrganismos sejam capazes de se tornarem resistentes aos fármacos, neste estudo, destacamos estirpes de *P. aeruginosa*, esse microrganismo faz parte da lista das bactérias que mais comumente causam infecções hospitalares, em especial, nos pacientes internados em Unidades de Terapia Intensiva (UTI's). Ademais, a *P. aeruginosa* é bastante relacionada com a formação de biofilmes, que aparece como a principal causa uma variedade de infecções provocadas por esse microrganismo, visto que a formação desses agregados microbianos dificulta ainda mais tratamento (BONEZ et al., 2015).

3.4 *Pseudomonas aeruginosa*

P. aeruginosa, refere-se a uma espécie de bactéria, classificada como Gram negativa de conformação reta ou levemente curva são aeróbios estritos e não são capazes de fermentar glicose. Esta bactéria é bastante conhecida por acometer indivíduos imunocomprometidos, entretanto, pessoas saudáveis também podem desenvolver doenças leves, como otites e erupções cutâneas mais generalizadas, principalmente após a exposição à água. Infecções oculares também podem ocorrer após uso prolongado de lentes de contato. Comumente identificada como agente causador de infecções do trato urinário e do sistema respiratório, assim como dermatites, bacteremias, infecções dos tecidos moles e sistêmicas (SELEZSKA et al., 2012).

Causadora de infecções nosocomiais graves, a *P. aeruginosa*, em muitos casos é o principal agente etiológico de pneumonia, infecções sanguíneas e pós-cirúrgicas que podem levar a sérias complicações e até mesmo à morte. É a bactéria mais frequentemente isoladas no setor de bacteriologia de laboratórios clínicos

(ROSSI, 2011). No país, aparece como o terceiro patógenos mais frequente em UTIs, onde são relatados em 30% das infecções sanguínea relacionadas ao uso de cateteres, e 36,6% apresentam resistência ao Imipenem (IPM) (NEVES et al., 2011).

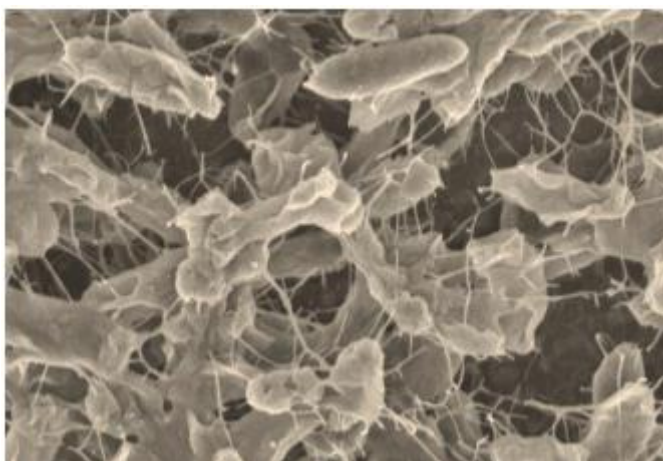
As Infecções agudas provocadas pela *P. aeruginosa* geralmente estão relacionadas a células livres, planctônicas, ao passo que as infecções crônicas estão comumente associadas ao modo séssil de crescimento, que são denominados biofilmes (MAUNDERS & WELCH, 2017). Os biofilmes aparecem como um relevante recurso utilizado por esses microrganismos para se protegerem aos tratamentos realizados. A Fibrose Cística (FC), é um exemplo de infecção tecidual associadas a formação de biofilmes, assim como, infecções de feridas crônicas, otites e prostatites por *P. aeruginosa*. Além disso, já foram descobertos em quase todos os tipos de implantes médico-hospitalares, principalmente em próteses valvares cardíacas, marca-passos, próteses articulares e cateteres intravenosos, evidenciando assim, outro importante mecanismo atribuído às infecções nosocomiais (RYBTKE et al., 2015).

Acerca dessa adesão às superfícies, a família das *Pseudomonadaceae* é uma das mais pesquisadas. Isso se deve ao fato de que a família apresenta grande habilidade para formar biofilmes em uma ampla variedade de materiais, principalmente em implante de dispositivos médicos (cateteres, tubos e sondas), assim como em tecidos vivos (pulmões, feridas e queimaduras), matérias de alumínio (encontradas em aparelhos odontológicos) e lentes de contato, ocasionando dano ocular (BIELECKI et al., 2008; BORGES et al., 2014; WALKER; MOORE, 2014; HØIBY, 2014). Tendo em vista que os biofilmes formados por de *P. aeruginosa* são tolerantes a uma série de antimicrobianos e biocidas sob uma variedade de condições de crescimento, o problema se agrava pelo fato de que isolados clínicos multirresistentes, possuem maior habilidade de desenvolver biofilmes (SHARMA et al., 2014).

3.5 BIOFILME

O termo biofilme descreve a forma de vida microbiana sésil, caracterizada pela adesão de microrganismos a alguma superfície (biótica ou abiótica). A arquitetura dos biofilmes é composta por uma matriz de substâncias poliméricas extracelulares que confere proteção as células microbianas, o que por consequência possibilita a sobrevivência dos microrganismos em ambientes hostis e torna o tratamento das infecções relacionadas com biofilmes, mais complexos (figura 4). Além disso, um biofilme pode ser composto por espécies heterogêneas, permitindo assim a coexistência de diferentes microrganismos em sua estrutura. Estima-se que a cerca de 90% dos microrganismos formam biofilmes e que teoricamente não existe superfície que não possa ser colonizada por microrganismos (seja ela natural ou sintética) (COSTERTON et al.,2003; HØIBY et al., 2014).

Figura 4 - Imagem de um biofilme de *P. aeruginosa* formado, mostra a produção de Substâncias Poliméricas Extracelulares (SPE) e o envolvimento das células bacterianas em meio a matriz produzida.



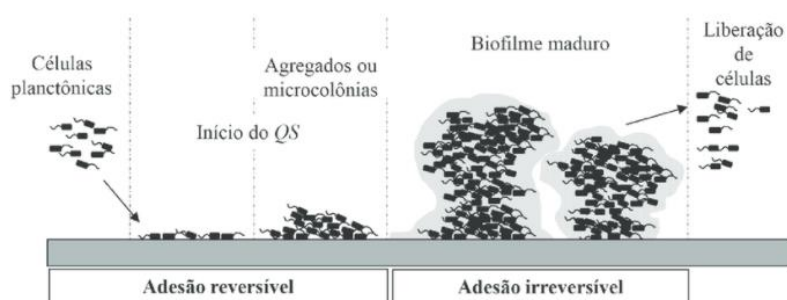
Fonte: Galeria de imagens da escola de saúde da Universidade de Peters. Disponível em: <http://eyemicrobiology.upmc.com/PhotoGalleryBiofilms.html>.

Os microrganismos quando em biofilme têm sua fisiologia modificada, tornando-se mais resistentes, pois, dificultam a atuação de agentes germicidas e agem como uma barreira de filtragem, gerando uma penetração reduzida de agentes antimicrobianos em geral. A matriz também protege os microrganismos contra a

dessecação, oxidação, radiação ultravioleta e defesa imunitária (FLEMMING; WINGENDER, 2010). A formação dos biofilmes, respeita uma série de processos químicos, físicos e biológicos. O primeiro é o da adesão microbiana, onde ocorre a aproximação aleatória das células planctônicas, através do movimento *browniano* e força gravitacional, ou de modo induzido, por meio da motilidade com o auxílio de pili e flagelos (CARPENTIER; CERF, 2003). A segunda etapa, consiste na transição do estágio reversível para o irreversível, onde as bactérias iniciam a secreção de substâncias que serão responsáveis pela manutenção da adesão e da camada que envolve o biofilme. Ao passo que os nutrientes se acumulam, micro colônias altamente unidas, de mesma espécie ou não, são originadas, tornando o biofilme irreversível (GUPTA et al., 2015).

A maturação do biofilme, inicia-se com a formação de micro colônias, estes apresentam estrutura semelhante a cogumelos, formando múltiplas camadas, por poros e canais de água que funcionam como um sistema de troca de nutrientes, oxigênio e metabólitos que precisam ser secretados para fora do biofilme. A espessura de um biofilme maduro pode chegar até 10 μm , (DONLAN, 2002). Com isso, depois do amadurecimento da massa microbiana, alguns microrganismos se desprendem, assim colonizam novos ambientes e se tornarem fontes de contaminação, a figura 5 ilustra todas as etapas de formação do biofilme (GARNETT; MATTHEWS, 2013).

Figura 5 - Ilustração das etapas da formação de biofilmes.



Fonte: Adaptado de Macedo e Abraham (2009).

A arquitetura dos biofilmes permite a circulação de água, oxigênio e nutrientes favorecendo a captação de elementos necessários à sobrevivência, pois devido à

retenção de enzimas extracelulares, um sistema versátil é gerado, onde os nutrientes são captados e dissolvidos a partir da água existente, permitindo que sejam utilizados como fontes de energia (COSTERTON et al., 2003). Sua matriz exopolissacarídica também é responsável por manter as células bem próximas dentro da estrutura do biofilme, permitindo, fortes interações intercelulares (FLEMMING; WINGENDER, 2010). Além disso as células, dentro da estrutura do biofilme, se comunicam entre si por meio de moléculas químicas exibindo um modo de vida organizado onde se estabelecem atividades coordenadas, esta comunicação é chamada de *Quórum Sensing* (QS) (DONLAN, 2002). Esse comportamento só é percebido quando os microrganismos atingem uma determinada densidade populacional limitante, do contrário, se comportam como simples organismos celulares (BHARDWAJ et al., 2013).

3.5.1 Estratégias frente o biofilme

Devido ao uso indiscriminado dos antimicrobianos convencionais e a estrutura complexa formada pelos biofilmes, a maioria dos fármacos não são efetivos contra. Com dados relacionados aos ensaios *in vitro*, têm sido indicados que as células bacterianas sésseis, se tornaram mais resistentes à ação de antimicrobianos, em função dos mecanismos de resistência encontrados (HOIBY et al., 2010). Como exemplo, a penetração em baixas concentrações de fármacos antimicrobianos através da matriz polissacarídica, a resposta fisiológica dos microrganismos que se encontram na formação dos biofilmes e a presença de células que resistentes à morte comumente chamadas de *persistenter cells* (LEWIS, 2007).

Frente a *P. aeruginosa*, que é uma potente formadora de biofilme, há relatos da redução da ação eficaz de antimicrobianos em estudos, destacando-se a diminuição da sensibilidade de fármacos que possuam um maior espectro (ANDRADE et al., 2003). Com isso, há também uma resistência por mutações do microrganismo, pela produção de enzimas betalactamases e metallo-beta-lactamases, que geralmente ocorrem em pacientes com um tempo de internação elevado e um uso contínuo de antimicrobianos (KIFFER et al., 2003)

Outro importante elemento de *P. aeruginosa* é a presença de múltiplos mecanismos em um único hospedeiro, ocasionando uma resistência cruzada aos antimicrobianos, resultando em uma co-resistência e conseqüentemente à

resistência a vários fármacos (JAY, 1996). Diante disso, foram estudados, na presente dissertação, os mecanismos de ação dos fármacos: Cloridrato de Cefepima[®], Imipenem[®] Monoidratado e Cilastatina Sódica, além de Sulfato de Polimixina B[®], que possuem ação frente a *P. aeruginosa* (e são as principais opções terapêuticas utilizadas na prática clínica no tratamento de infecções por *P. aeruginosa*) para serem associados com o fármaco Citrato de Sildenafil.

Cloridrato de Cefepima[®] tem como a ação inibir a síntese da parede celular bacteriana, possui um amplo espectro de atividade contra cepas de bactérias Gram-positivas e Gram-negativa. Imipenem[®] Monoidratado possui um amplo espectro de atividade contra espécies Gram-negativas, juntamente com Cilastatina Sódica inclui o tratamento em espécies incluindo *P. aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*. As polimixinas aumentam a permeabilidade da célula bacteriana, pois quebram a estrutura da membrana celular. Sulfato de Polimixina B[®] tem ação contra todos os bacilos Gram-negativos, exceto *Proteus sp.*

4 Manuscrito

Título: ATIVIDADE ANTIMICROBIANA, SINÉRGICA E ANTIBIOFILME DE
SILDENAFIL FRENTE A *Pseudomonas aeruginosa*

Autores: Thais de Moraes Barin^{a*}, Camilla Fillipi dos Santos Alves^{a*}, Cristiane Antunes Teixeira^{a*}, Camila Marina Verdi^{a*}, Kelly Schneider Moreira^{b*}, Thiago Burgo^b, Roberto Christ Vianna Santos^c.

Após a realização das alterações sugeridas pela banca examinadora, o manuscrito abaixo será traduzido para o Inglês e submetido ao periódico ***Microbial Pathogenesis*** (Fator de impacto: 2.914, Qualis: B2).

ATIVIDADE ANTIMICROBIANA, SINÉRGICA E ANTIBIOFILME DE SILDENAFIL FRENTE A *Pseudomonas aeruginosa*

Thais de Moraes Barin^{a*}, Camilla Filippi dos Santos Alves^{a*}, Cristiane Antunes Teixeira^{a*}, Camila Marina Verdi^{a*}, Kelly Schneider Moreira^{b*}, Thiago Burgo^b, Roberto Christ Vianna Santos^c.

^a Department of Industrial Pharmacy, Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Santa Maria, Brazil.

^b Department of Chemistry, Federal University of Santa Maria (UFSM), Santa Maria/RS, Brazil.

^c Oral Microbiology Research Laboratory, Microbiology and Parasitology Department, Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Santa Maria, Brazil. Laboratório de Parasitologia Veterinária (LPAVET), Microbiology and Parasitology Department, Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Santa Maria, Brazil.

Corresponding author

^a Thais de Moraes Barin, Departamento de Microbiologia e Parasitologia, Laboratório de Pesquisa em Microbiologia Oral. Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Maria. Av. Roraima 1000 - CEP 97105-900. Santa Maria - RS - Brasil

E-mail: thaty_barin@hotmail.com

RESUMO

Este estudo optou por realizar testes frente ao fármaco Citrato de Sildenafil, exemplar de reposicionamento farmacológico, contra o patógeno de origem oportunista *Pseudomonas aeruginosa*, ao qual é comumente conhecida como potencial formadora de biofilme. Avaliando o potencial antimicrobiano, efeito sinérgico e antibiofilme, pelas técnicas de microdiluição em caldo, *checkerboard* e microscopia de força atômica. Citrato de Sildenafil apresentou atividade antimicrobiana, sendo capaz de inibir o crescimento bacteriano em concentrações inibitórias mínimas (CIMs) variando de 3,12 mg/mL a 6,25 mg/mL e as concentrações bactericidas mínimas (CBMs) entre 3,12 mg/mL a 25 mg/mL. Quando analisadas a relação com associação aos fármacos Cloridrato de Cefepima[®], Imipenem[®] Monoidratado e Cilastatina Sódica e Sulfato de Polimixina B[®], todos apresentaram efeito potencializador, resultando em um efeito sinérgico. O Citrato de Sildenafil foi capaz de inibir e destruir o biofilme reduzindo a biomassa total em 87,17% a 83,81%, respectivamente. A microscopia de força atômica indicou a ação positiva do Sildenafil tanto na destruição quanto na inibição do biofilme, diminuindo a amplitude do biofilme, confirmando os resultados anteriores. Devido aos resultados encontrados o fármaco Citrato de Sildenafil torna-se uma alternativa promissora para o tratamento e prevenção ao patógeno *P. aeruginosa*.

Palavras-chave: Reposicionamento. Citrato de Sildenafil. *Pseudomonas aeruginosa*. Resistência antimicrobiana. Biofilme.

INTRODUÇÃO

O reposicionamento de fármacos é caracterizado como um processo que consiste na identificação e na pesquisa de novas indicações terapêuticas já existentes, direcionando o fármaco para o uso no tratamento de outras patologias. Esta alternativa que requer menos tempo e menos etapas para o seu desenvolvimento, tendo em vista que o perfil do medicamento é conhecido, desse modo, o investimento torna-se menos oneroso (XUE et al., 2018). Um exemplo de reposicionamento farmacológico ocorre com o Citrato de Sildenafil, fármaco inicialmente estudado para o tratamento de angina e que atualmente é utilizado no tratamento da disfunção erétil, tratamento da Hipertensão Arterial Pulmonar Idiopática (HAPI) e que também demonstrou eficácia terapêutica em doenças inflamatórias crônicas (BELLA; DEYOUNG; BROCK, 2007; CRISTINA et al., 2005).

Devido ao uso indiscriminado dos antimicrobianos, o tratamento de infecções enfrenta diferentes obstáculos, que acarretam no alto custo e resultam muitas vezes em altas taxas de mortalidade (JACKSON; AGBOKE; NWOKE, 2009). Dentre os diversos obstáculos, existem processos que aumentam a resistência desses microrganismos, como por exemplo a formação dos biofilmes, que são estruturas funcionais capazes de potencializar o processo patogênico (CAIXETA et al., 2012).

Caracterizada como importante formadora de biofilme e causadora de infecções hospitalares graves, *Pseudomonas aeruginosa* é um bacilos Gram-negativo, aeróbia e oportunista (EKINS et al., 2011). Diante disso, este estudo teve como objetivo, avaliar pela primeira vez, a atividade antimicrobiana, antibiofilme e o sinergismo do fármaco Citrato de Sildenafil.

MATERIAIS E MÉTODOS

Microrganismos

Neste estudo, foram utilizadas as cepas de *P.aeruginosa* (PA01) como cepa padrão de formação de biofilme em todos os ensaios, além de dez isolados clínicos (IC) de *P.aeruginosa*, identificados pelo equipamento semi automatizado MicroScan

Autoscan-4A da fabricante Siemens, conforme a metodologia colorimétrica por espectrofotômetro. Os isolados foram descritos conforme demonstra a tabela 1:

Tabela 1 - Isolados Clínicos de *P. aeruginosa*, seus respectivos locais de coleta e as siglas.

ISOLADOS - LOCAIS	SIGLAS
1 isolado – Urina	1PAUR
2 isolado - Hemocultura – Cateter Central	2PAHC
3 isolado – Urina	3PAUR
4 isolado – Urina	4PAUR
5 isolado – Escarro	5PAES
6 isolado – Secreção Traqueal	6PAST
7 isolado – Escarro	7PAES
8 isolado – Urina	8PAUR
9 isolado – Urina	9PAUR
10 isolado – Urina	10PAUR

PAUR (1,3,4,8,9 e 10) isolados de amostra de urina, PAHC (2) isolado de hemocultura de cateter central, PAES (5,7) isolados de amostra de escarro e PAST (6) amostra de secreção traqueal.

Fármacos

O Citrato de Sildenafil, Cloridrato de Cefepima[®], Imipenem[®] Monoidratado e Cilastatina Sódica e Sulfato de Polimixina B[®], foram obtidos comercialmente e reconstituídos conforme o indicado na bula. A solução estoque do Citrato de Sildenafil ocorreu segundo a farmacopeia brasileira, de acordo com o protocolo aprovado pelo “Clinical and Laboratory Standards Institute” (CLSI, 2018), que define a solubilidade em água de injeção estéril, sendo realizada em tubos de ensaio estéreis, com a diluição do fármaco em 100mg/mL.

Atividade antimicrobiana

Preparação dos inóculos

Os inóculos das cepas de *P. aeruginosa* (PA01) e isolados clínicos, foram padronizados de acordo com as diretrizes do CLSI (2018). Colônias isoladas foram cultivadas por 18–24 h em Mueller Hinton Agar (Himedia) e a suspensão foi preparada em solução salina (NaCl 0,85%) com densidade ajustada para 0,5 na escala de McFarland ($1,5 \times 10^8$ CFU / mL) (CLSI, 2018).

Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Determinação da Concentração Bactericida Mínima (CBM)

A CIM determinada pelo método de microdiluição em caldo em placas de 96 poços (CLSI, 2018). Resumidamente, foram adicionados em todos os poços 100 µL de caldo Brain Heart Infusion (BHI), em seguida adicionado 100 µL de tratamento com o fármaco na coluna 1 e então realizada a diluição seriada até a 10ª coluna. O inóculo preparado na escala 0,5 McFarland, e diluídos 1:10, apresentando aproximadamente $1,5 \times 10^8$ unidades formadoras de colônia (UFC/mL). A diluição do fármaco foi realizada em 100mg/mL com água de injeção estéril, após a realização da diluição adicionado 100 µL do citrato de sildenafil em cada poço, adicionado 10 µL do inóculo bacteriano em cada poço a ser testado, exceto na coluna 11 (controle negativo). O controle positivo realizado na 12ª coluna, sendo o poço constituído apenas com o inóculo e caldo BHI, enquanto o controle negativo apenas composto pelo caldo. As placas foram envolvidas em alumínio e incubadas por 24 horas a 37°C. O ensaio foi realizado em triplicata. Para detecção de crescimento do microrganismo o ensaio foi revelado com corante cloreto de 2,3,5-trifenil tetrazólio (TSI), após a concentração mais baixa que não mostrar coloração é considerada o CIM. Para a CBM, foi semeado em ágar MH 1 µL de cada poço onde não foi observado o crescimento microbiano. As placas então incubadas a 37°C, por 24 horas em estufa bacteriológica. Os valores de CBM foram determinados como sendo a menor concentração na qual não houve crescimento bacteriano visível no ágar.

Atividade antibiofilme

Formação de biofilme

A cepa padrão PA01 e os IC foram avaliados sobre a capacidade de formar biofilmes. Para o teste de formação do biofilme, utilizamos placas de 96 poços, onde adicionamos 100 µL de caldo MH, preenchidos com alíquotas de 100 µL com a diluição do Citrato de Sildenafil e 10 µL do inoculo de cada cepa ajustado na escala de 0,5 de McFarland, após as placas foram incubadas em estufa a 37°C, por 24 e 48 horas. Após o tempo de incubação, os poços foram lavados por no mínimo 3 vezes com água destilada estéril, deixando a placa secar a temperatura ambiente por 60 minutos, para a remoção das células fracamente aderidas (planctônicas) e em seguida coradas com cristal violeta e o biofilme fixado com adição de 200 µL de etanol 95%. As absorbâncias foram medidas em espectrofotômetro ajustado a 570nm. Os testes foram realizados em triplicata. A PA01 foi utilizada nos testes com

IC como controle positivo e o meio de cultura sem inóculo como controle negativo.(BONEZ et al., 2017).

Inibição e destruição da formação do biofilme

Para a avaliação da inibição e destruição de biofilme, foi realizado como tratamento o Citrato de Sildenafil nas concentrações definidas a partir dos resultados de CIM e CBM. Para inibição da formação do biofilme, as placas de 96 poços foram preparadas através da mesma metodologia supracitada (item 2.4.1), com a adição do tratamento de Citrato de Sildenafil em concentrações sub inibitórias, então, as placas foram incubadas à 37°C, por 24 horas. Para destruição, os tratamentos são realizados após 24h de incubação das placas, com a finalidade de desmanchar a massa microbiana já aderidas, após os tratamentos as placas voltam a ser incubadas por 24h a 37°C. Após o tempo de incubação, os poços foram lavados e identificados através da mesma metodologia supracitada (item 2.4.1) (BONEZ et al.,).

Microscopia de força atômica

Para análise da estrutura do biofilme foi realizada os mesmos testes para inibição e destruição do biofilme em placas de 24 poços, sendo colocadas placas de polietileno dentro dos poços para obtenção dos biofilmes na estrutura e após a leitura da microscopia. As placas de polietileno foram fixadas em etanol a 95%. A dispersão resultante foi colocada em pequenos pedaços quadrados de mica recém-cortada e fotografada. Os mapas topográficos foram registrados em um microscópio Park NX10 (Park Systems, Suwon - Coréia) equipado com um *software* SmartScan versão 1.0.RTM11a. As medições foram realizadas utilizando uma sonda TAP300G com frequência de ressonância nominal de 300 kHz e constante de força de 40 N / m. Todas as medições foram feitas em condições ambientais com temperatura ambiente de $21 \pm 50C$ e umidade relativa de $55 \pm 10\%$ com taxa de varredura de 0,35 Hz. As imagens foram tratadas *offline* usando o *software* XEI versão 4.3.4Build22.RTM1 (CORDENONSI BONEZ et al., 2015). Conforme a dimensão fractal, ao qual é uma análise baseada na rugosidade da superfície que tem como conceito básico a noção intuitiva de preenchimento do espaço, foi realizada a

análise das amostras com o biofilme por características topográficas de maior complexidade, ou seja, maior dimensão fractal (ASSIS et al., 2008).

Checkerboard

Teste que tem como objetivo ser utilizado para quantificar o efeito de combinações de fármacos em crescimento *in vitro*, para que com isso os resultados possam gerar um efeito potencializador da ação antimicrobiana. Nesse contexto, optou-se por avaliar a associação de três fármacos (utilizados na prática clínica), os testes tiveram início sendo realizados as CIM dos três fármacos que seriam testados para a associação, sendo eles Cloridrato de Cefepima[®], Imipenem[®] Monoidratado e Cilastatina Sódica e Sulfato de Polimixina B[®], com suas concentrações iniciais 200mg/ml, 50mg/ml e 25mg/ml consecutivamente, posteriormente foi determinado o índice de concentração inibitória fracionária (ICIF).

Em microplacas de poliestireno com 96 poços, foram adicionadas inicialmente 50µL do meio de cultura Muller Hinton (MH). Após foram adicionados 50 µL da diluição do Citrato de Sildenafil na coluna 2 e diluído seriadamente até a 12^a coluna. Devido ser adicionado um segundo fármaco para ser realizada a associação, a concentração inicial do fármaco foi 4x maior do que a final desejada. Após esse procedimento foram adicionados 50 µL do fármaco (Cloridrato de Cefepima[®], Imipenem[®] Monoidratado e Cilastatina Sódica e Sulfato de Polimixina B[®]), as diluições desses fármacos foram realizadas fora da placa e encontravam-se 2x mais concentrados do que a concentração final desejada. As combinações testadas consistiram de Citrato de Sildenafil + Cloridrato de Cefepima[®], Citrato de Sildenafil + Imipenem[®] Monoidratado e Cilastatina Sódica e Citrato de Sildenafil + Sulfato de Polimixina B[®]. Adicionados 10 µL do inoculo em todos os poços, previamente ajustado e diluído no mesmo meio. Na coluna 1 linha A o controle positivo e na coluna 12 linha H o controle negativo. Após 24 horas de incubação à 37 °C foi realizada a leitura das placas. Para avaliar a interação dos agentes foi calculada a concentração inibitória fracionária (CIF) de cada agente dividindo a CIM do agente em combinação pela CIM do agente isolado. Somando-se os valores das CIFs teve-se determinado o Índice de Concentração Inibitória Fracionária (ICIF) resultante da

combinação dos agentes. O sinergismo foi definido como $ICIF \leq 0,5$. Indiferença $0,5 < ICIF \leq 4,0$ e antagonismo $ICIF > 4,0$ (JOHNSON et al., 2004).

Após as placas serem incubadas por 24h, a leitura foi realizada visualmente observando a turbidez macroscópica ou sua ausência nas amostras nos poços. Interpretação do sinergismo calculada pela combinação de antimicrobianos, analisada pelo somatório dos índices de concentração inibitória fracionada (ICIF), após o valor do ICIF obtido, o resultado das interações entre os fármacos é avaliado seguindo a classificação descrita na tabela 2 (KUMAR et al., 2013).

Tabela 2 - Resultados dos valores de Índice de concentração inibitória fracionada (ICIF) às diferentes interações.

Interação	ICIF
Sinergismo	$CIF \leq 0,5$
Aditivo	$0,5 < CIF \leq 1$
Indiferente	$1 < CIF \leq 2$
Antagonismo	$CIF > 2$

ICIF: índice de concentração fracionada; CIF: concentração inibitória fracionada

Análise Estatística

A análise estatística das atividades para organizar os dados farmacológicas foi realizada através da análise da variância (ANOVA) de uma via. Os ensaios estatísticos realizados no programa Systat 11 (Systat Software, Inc., Richmond, CA). Os resultados foram então considerados significativos quando $p < 0,05$. Para a realização dos gráficos utilizados o software GraphPad Prism[®] 6.

RESULTADOS

Atividade antimicrobiana

Os resultados obtidos com o teste de microdiluição em caldo, demonstraram que o Citrato de Sildenafil, apresenta atividade antimicrobiana, tanto frente a PA01, quanto aos isolados clínicos (IC) (Tabela 3). Os valores das CIM variaram de

3,12 mg/mL à 6,25 mg/mL, onde os IC 4PAUR, 6AST e 7PAES, apresentaram um perfil de maior suscetibilidade ao fármaco.

Os valores da CBM alcançados foram de 3,12 mg/mL até 25 mg/mL, sendo que a maioria dos IC teve resultado no valor intermediário das concentrações em 12,5mg/ml e os IC com a concentração mais baixa foram 5PAES e 7PAES.

Tabela 3 - Resultados da PA01 e dos IC da Concentração Inibitória Mínima e da Concentração Bactericida Mínima (CBM).

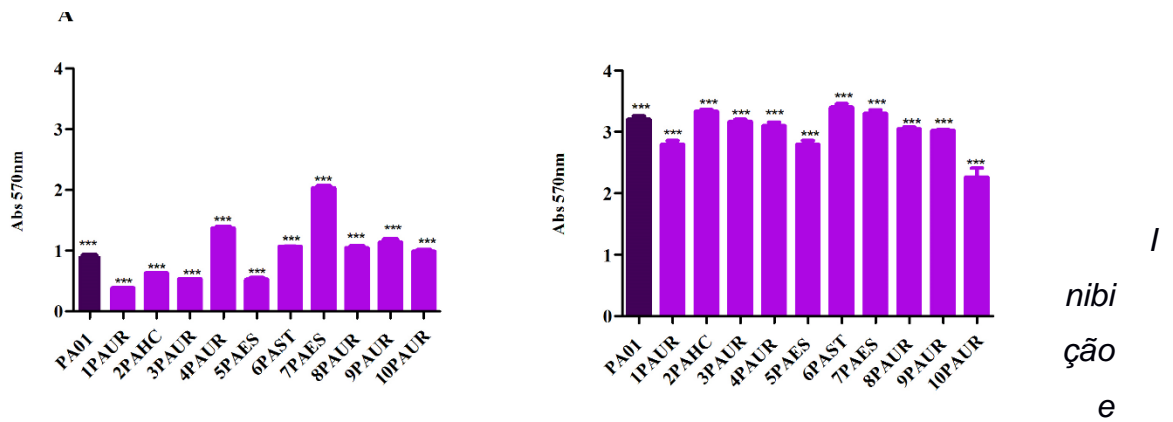
Estirpes	CIM	CBM
PA01	3,12mg/mL	6,25mg/mL
1PAUR	6,25mg/mL	12,5mg/mL
2PAHC	6,25mg/mL	12,5mg/mL
3PAUR	6,25mg/mL	12,5mg/mL
4PAUR	3,12mg/mL	25mg/mL
5PAES	6,25mg/mL	3,12mg/mL
6PAST	3,12mg/mL	12,5mg/mL
7PAES	3,12mg/mL	3,12mg/mL
8PAUR	6,25mg/mL	12,5mg/mL
9PAUR	6,25mg/mL	12,5mg/mL
10PAUR	6,25mg/mL	12,5mg/mL

Atividade antibiofilme

Avaliação da formação de biofilme

Em um primeiro momento, avaliamos a capacidade de formação de biofilme dos IC, as absorbâncias obtidas foram comparadas com a cepa padrão *PA01*. Observamos que em 24h de incubação, os IC 1PAUR, 2PAHC, 3PAUR e 5PAES apresentaram absorbância significativamente menor do que a *PA01*, sendo assim, classificadas como não formadoras de biofilme. Por outro lado, quando as placas foram incubadas por 48h os IC 2PAHC e 3PAUR demonstraram um diferente perfil, com absorbâncias maior e igual à *PA01*, respectivamente (Figura 1A e 1B).

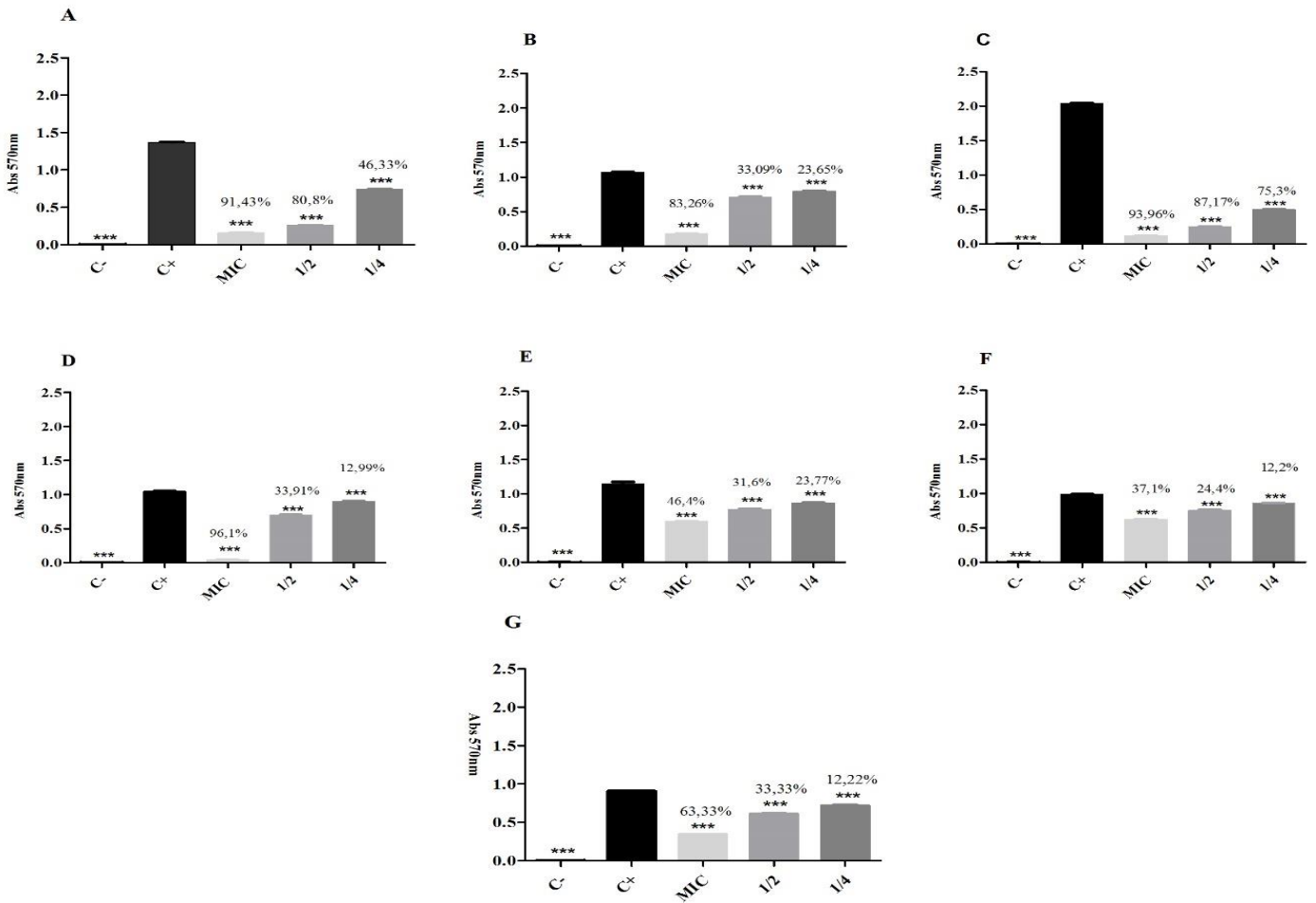
Figura 6- Perfil de formação de biofilme dos isolados clínicos de *P.aeruginosa*, em incubação, 24 e 48h respectivamente.



destruição do biofilme

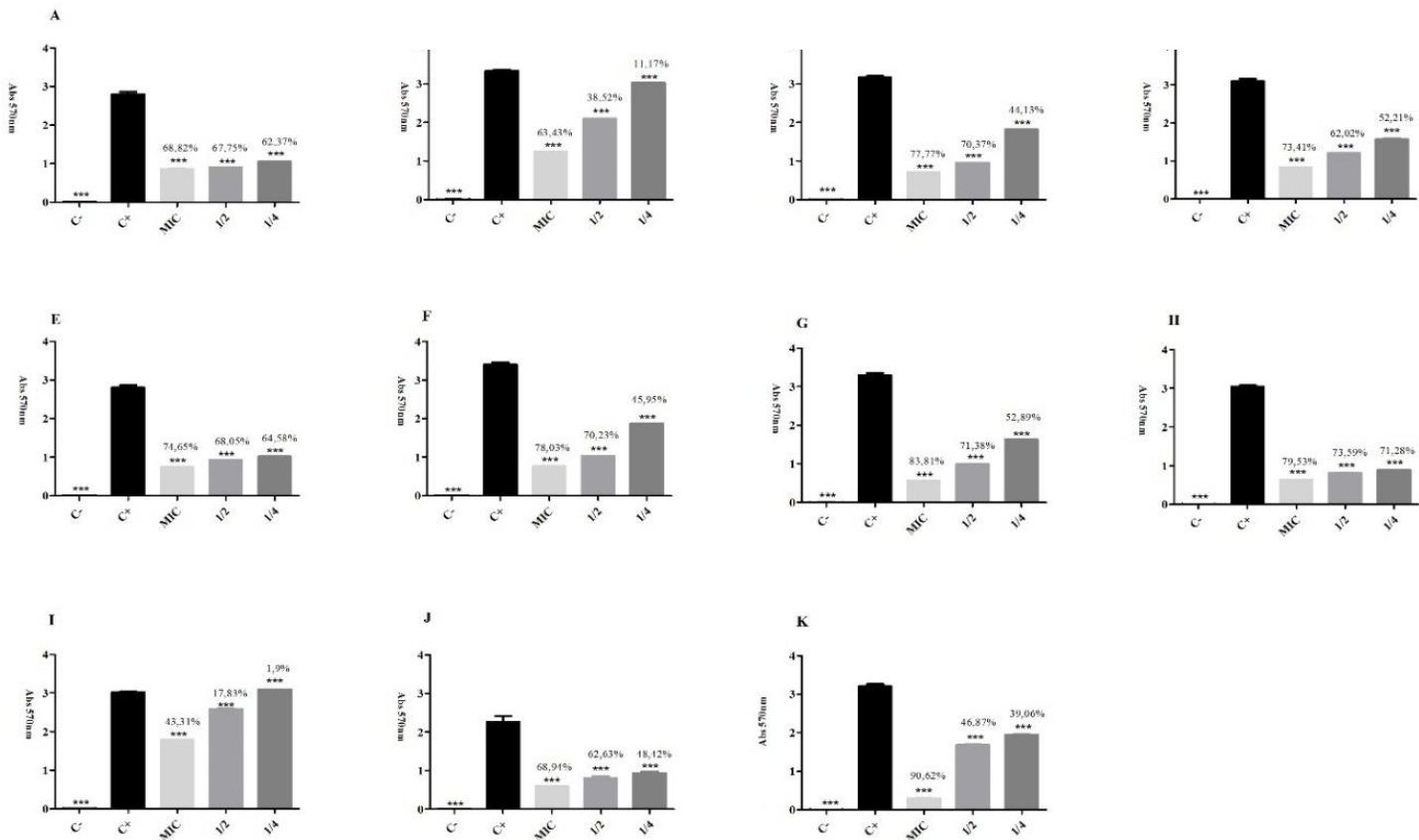
Os resultados da inibição revelaram que o fármaco teve ação e foi capaz de inibir a formação do biofilme em todas as concentrações testadas (3,12mg/mL a 0,78mg/mL). A figura 3G, demonstra que na concentração subinibitória de metade da MIC ($\frac{1}{2}$ MIC 1,56mg/mL), o Citrato de Sildenafil foi capaz de inibir a formação de biofilme de PA01 em porcentagem de 33,33%. Um perfil semelhante foi observado nos IC (Figura 3A,3B,3C,3D,3E,3F), onde destacamos a figura 3C, que exibe uma porcentagem de inibição de 87,17%, mesmo em baixas concentrações do fármaco.

Figura 7 - Gráficos do resultado da inibição da formação do biofilme de *P. aeruginosa*, onde cada gráfico demonstra o resultado de um IC específico, Gráficos 3A (4PAUR), 3B (6PAST), 3C (7PAES), 3D (8PAUR), 3E (9PAUR), 3F (10PAUR) e 3G (PA01).



A destruição do biofilme mostra a capacidade que o fármaco tem em eliminar a matriz protetora que possibilita a sobrevivência dos microrganismos em ambientes hostis e torna o tratamento das infecções relacionadas com biofilmes, mais complexos (MILLEZI et al., 2012). A capacidade do Citrato de Sildenafil em destruir a massa microbiana formada pela *PA01* está ilustrada no gráfico K da figura 4, onde o fármaco eliminou 46,87% do biofilme, em concentração subinibitória. Nos isolados a destruição no valor do MIC ficou em torno de 83,81% a 43,31%, sendo a amostra da figura 3G demonstra valores maiores de destruição sendo 83,81% no valor do MIC, 73,38% em $\frac{1}{2}$ MIC e 52,89% em $\frac{1}{4}$ do MIC.

Figura 8 - Gráficos do resultado da destruição da formação do biofilme de *P. aeruginosa*, onde cada gráfico demonstra o resultado de um IC específico, Gráficos 4A (1PAUR), 4B (2PAHC), 4C (3PAUR), 4D (4PAUR), 4E (5PAES), 4F (6PAST), 4G (7PAES), 4H (8PAUR), 4I (9PAUR), 4J, (10PAUR) e 4K (PA01).



Microscopia de Força Atômica

As Fig. 9 e 10 mostram mapas de topografia 2D e 3D obtidos por Microscopia de Força Atômica (MFA) para substratos de HDPE primitivos e tratados com CIM (3,12 mg / mL) + 100 mg / mL de Citrato de Sildenafil submetidos ao processo de destruição e inibição. O controle negativo mostra uma superfície lisa, característica do HDPE. Por outro lado, a amostra de controle positivo apresenta uma diferença significativa na topografia quando comparada com o polímero puro. Nas imagens 2D e 3D, podemos observar o biofilme formado na matriz evidenciado pela presença de matrizes poliméricas por estruturas bacterianas crescidas. As Figuras C-E indicam a ação positiva do composto tanto na destruição quanto na inibição do biofilme. Nós avaliamos por MFA em 3 concentrações sendo o valor de MIC, $\frac{1}{2}$ MIC e $\frac{1}{4}$ do MIC. Embora nas três concentrações o fármaco indique inibição e destruição do biofilme, o melhor resultado foi obtido com CIM 3,12 mg/mL, também comprovado por imagem topográfica onde podemos observar uma superfície mais uniforme e sem

estruturas bacterianas. Os métodos de destruição e inibição apresentam comportamento semelhante em termos de imagens topográficas o que confirma a ação do fármaco na eliminação da matriz protetora da bactéria e na inibição da formação do biofilme. Pela análise da dimensão fractal, as amostras com o biofilme apresentam características topográficas de maior complexidade, ou seja, maior dimensão fractal, os valores do controle positivo da inibição e destruição ficaram entre 2,165 e 2,163, respectivamente. Foi demonstrado melhor resultado nas imagens com os valores de MIC, apresentando valores de 2,135 e 2,093, mostrando que o fármaco obteve ação frente a cepa PA01. Porém, para obter-se resultados mais concretos de valores deve ser avaliada pelo menos 5 imagens, já que os valores do 1/4 e 1/2 possuíam resultados próximos do C+.

Figura 9 - Imagens que demonstram a inibição do biofilme de *P. aeruginosa* frente ao fármaco Citrato de Sildenafil por meio da MFA.

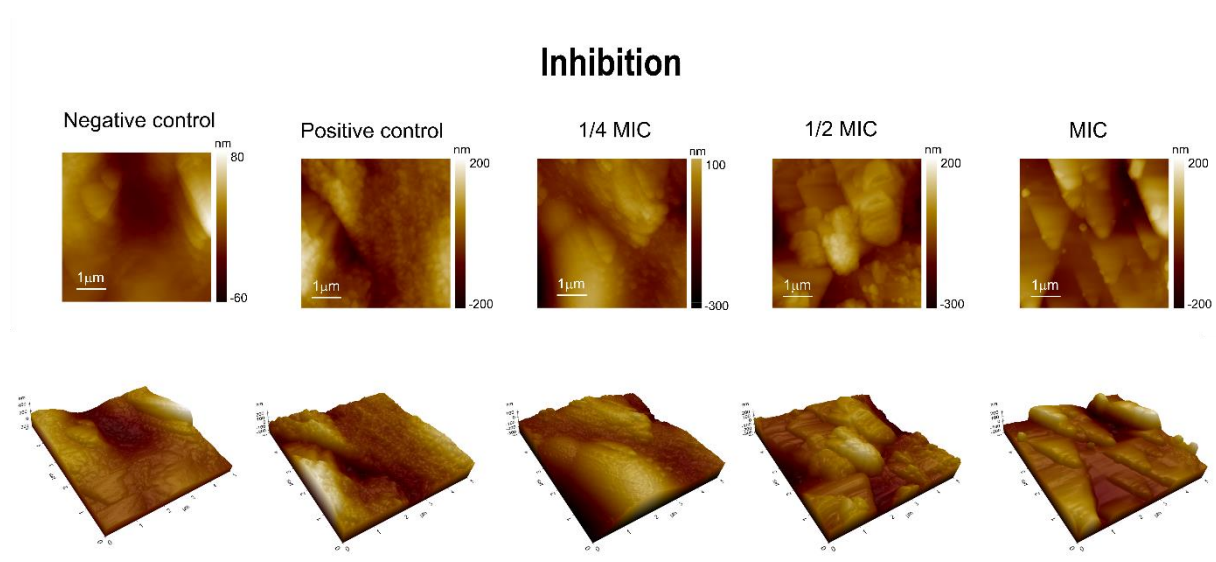
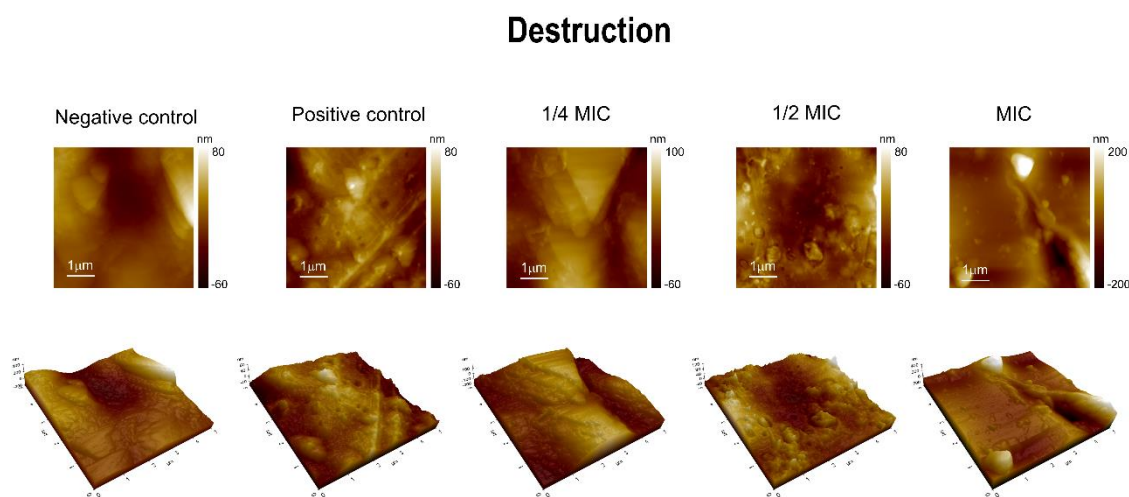


Figura 10 - Imagens que demonstram a destruição do biofilme de *P. aeruginosa* frente ao fármaco Citrato de Sildenafil por meio da MFA.



Checkerboard

As concentrações dos antimicrobianos usados no ensaio foram determinadas de acordo com a CIM de cada um, sendo Cloridrato de Cefepima[®], Imipenem[®] Monoidratado e Cilastatina Sódica e Sulfato de Polimixina B[®], contra a cepa padrão PA01 e o isolado 7PAES. Os resultados do *checkerboard* foram avaliados segundo o índice FICI mais baixo de todos os poços não turvos foram testados ao longo da placa (BONAPACE et al., 2002). Seguindo este método ficou comprovado 100% de sinergismo nas interações dos antimicrobianos, com isso demonstrando um efeito promissor na associação dos fármacos, conforme demonstrado nas tabelas (4 e 5) abaixo.

Tabela 4 - Avaliação do sinergismo entre os fármacos Polimixina B e Citrato de Sildenafil, Citrato de Sildenafil e Cefepima e Citrato de Sildenafil e Imipenem frente o IC 7PAES.

SUBSTÂNCIA A / SUBSTÂNCIA B	RESULTADOS
POLIMIXINA B/ C.SIDENAFIL	
Media FICI	0,063
Range	0,6-0,7
% Sinergismo	100
% Aditividade/Indiferença	0

C. SIDENAFIL/ CEFEPIMA

Media FICI	0,093
Range	0,09-0,1
% Sinergismo	100
% Aditividade/Indiferença	0

C. SIDENAFIL/ IMIPENEM

Media FICI	0,187
Range	0,1-0,2
% Sinergismo	100
% Aditividade/Indiferença	0
% Antagonismo	0

Sinergismo: ICIF \leq 0,5; Indiferença: $0,5 < \text{ICIF} \leq 4,0$; Antagonismo: ICIF $>$ 4,0

Efeito sinérgico evidenciado na cepa padrão PA01, mostrando os resultados obtidos na associação dos fármacos sendo promissor juntamente com o Citrato de Sildenafil, conforme a tabela 5.

Tabela 5 - Avaliação do sinergismo entre os fármacos Citrato de Sildenafil e Polimixina B, Citrato de Sildenafil e Cefepime, Citrato de Sildenafil e Imipenem frente a PA01.

SUBSTÂNCIA A / SUBSTÂNCIA B	RESULTADOS
POLIMIXINA B/SIDENAFIL	
Menor FICI	0,063
Range	0,6-0,7
% Sinergismo	100
% Aditividade/Indiferença	0
SIDENAFIL/ CEFEPIME	
Media FICI	0,093
Range	0,09-0,1
% Sinergismo	100
% Aditividade/Indiferença	0
SIDENAFIL/ IMIPENEM	
Range	0,1-0,2
Media FICI	0,187
% Sinergismo	100
% Aditividade/Indiferença	0
% Antagonismo	0

Sinergismo: ICIF \leq 0,5; Indiferença: $0,5 < \text{ICIF} \leq 4,0$; Antagonismo: ICIF $>$ 4,0

DISCUSSÃO

O Citrato de Sildenafil, é um fármaco inibidor da enzima 5-fosfodiesterase (5PDE), presente em vários tecidos como o muscular liso e vascular. Inicialmente, este fármaco foi utilizado como uma primeira opção no tratamento clínico de Disfunção Erétil (DE), porém, atualmente o Citrato de Sildenafil é reposicionado como alternativa de tratamento à hipertensão pulmonar, possuindo uma eficácia e uma segurança em seu uso já comprovada em humanos (KUMAR; MALLA; KUMAR, 2013). Além disso, alguns estudos clínicos têm demonstrado que o Citrato de Sildenafil possui uma atividade terapêutica em doenças inflamatórias crônicas, como a disfunção endotelial, colite (que consiste em uma reação inflamatória localizada no cólon, geralmente infecciosa ou autoimune), doenças neuroinflamatórias, como também doenças no trato geniturinário que apresentam uma morbidade mais frequente em homens acima de 50 anos (RÖMLING; BALSALOBRE, 2012).

A relação do Citrato de Sildenafil com o tratamento de doenças infecciosas, desperta interesse, tendo em vista que atualmente, ocorre um aumento de casos de resistência microbiana e a produção de novos antimicrobianos não acompanham esses eventos. Neste cenário, o reposicionamento do fármaco seria uma vantajosa alternativa. Diante disso, no presente estudo, buscamos avaliar a atividade antimicrobiana e antibiofilme do Citrato de Sildenafil frente a PA01 e 10 diferentes isolados clínicos de *P. aeruginosa*. Os resultados obtidos demonstraram que o fármaco apresenta significativa atividade antimicrobiana, bem como, um relevante perfil de inibição e destruição da massa microbiana, mesmo quando o tratamento foi de baixa concentração. As imagens de microscopia corroboram com os nossos resultados, pois nelas, podemos visualizar a ação do Citrato de Sildenafil, frente a *P. aeruginosa* confirmando que o fármaco, mesmo em doses subinibitórias, surtiu efeito contra a formação e inibição dos biofilmes.

As infecções bacterianas estão envolvidas com a formação de biofilmes em mais de 80% dos casos, resultando em infecções crônicas e um alto índice de morbidade, segundo o “National Institutes of Health”. Com isso, principalmente no ambiente hospitalar, milhões de pacientes são afetados e geram gastos exorbitantes para os sistemas de saúde, em função do aumento da morbidade e mortalidade (MANN; WOZNIAK, 2012).

Neste contexto, a formação de biofilmes por estirpes de *P. aeruginosa* é relatada em vários casos infecciosos crônicos em humanos, como infecções de feridas crônicas, otites, prostatites, infecções do trato urinário e infecções relacionadas a dispositivos médicos, tais como cateteres intravenosos e válvulas cardíacas. Estas infecções são geradas principalmente pela adesão de microrganismos em comunidades multicelulares, os biofilmes, que provocam infecções que persistem e progridem no organismo mesmo com o tratamento. Desta forma, a formação do biofilme nos patógenos é um fator de virulência muito importante (RUBIN et al., 2011).

O mecanismo de ação do Citrato de Sildenafil, é bastante conhecido e tem como alvo inibir a enzima 5PDE, essa, hidrolisa a cGMP para GMP e cAMP para AMP. O bloqueio da 5PDE resulta em concentração aumentada de cGMP celular, que interage com proteína quinase G (PKG) levando à ativação do canal iônico, apoptose celular e glicogenólise. A PDE5 é amplamente distribuída entre vários tipos de células, por exemplo, nas vias aéreas, em células do músculo liso, células do músculo liso vascular, células do tecido epitelial e fibroblastos, bem como plaquetas e monócitos. Nos microrganismos a c-di-AMP está envolvida em importantes processos biológicos e comportamento celular, incluindo como as bactérias coordenam seu próprio ciclo de crescimento e replicação, como se adaptam às superfícies formando biofilmes, ou como são patogênicos. Tendo em vista que o Citrato de Sildenafil age no processo de hidrolização da cGMP, sugerimos que a atividade antimicrobiana e antibiofilme pode estar relacionada a este mecanismo (JENAL; REINDERS; LORI, 2017; ZYCH et al., 2019).

O efeito sinérgico do Citrato de Sildenafil, avaliamos através do método *checkerboard* juntamente com fármacos antimicrobianos amplamente utilizados na prática clínica. Observamos quando o tratamento com o CS é realizado em conjunto com antimicrobianos, ocorre um feito de sinergismo, ou seja, resulta em uma ação maior que seus efeitos quando utilizados de forma separada (BONAPACE et al., 2002). Através destes resultados é possível afirmar um potencial benéfico para a associação dos antimicrobianos testados, [®], Imipenem com o Citrato de Sildenafil, no tratamento frente a cepa padrão de *P. aeruginosa*. No entanto, se faz necessário avaliar mais IC isoladamente, pois cada isolado pode conter um mecanismo de

resistência específico, para que com isso possa ser identificado um resultado sinérgico mais abrangente.

Como o número de estudos recém-aprovados para novos antimicrobianos diminuiu significativamente na última década, houve um aumento no número de bactérias resistentes aos medicamentos já existentes. Apesar da necessidade de pesquisas mais aprofundadas, podemos sugerir que o Citrato de sildenafil pode ser uma promissora estratégia de tratamento para infecções bacterianas, tendo em vista a abordagem rápida e com uma terapêutica eficaz em combinações sinérgicas usando medicamentos aprovados.

CONCLUSÃO

Os resultados apresentados no trabalho mostram que o Citrato de Sildenafil, obteve resultados positivos nas ações antimicrobianas, antibiofilme e no sinergismo com os fármacos trabalhados. Demonstrando atividade antimicrobiana e bactericida frente a *P. aeruginosa* (PA01) e os 10 IC, obteve efeito de inibição e destruição da formação do biofilme frente a *P. aeruginosa* (PA01) e os 10 IC. Com a leitura da microscopia de força atômica (MFA) foi confirmada a ação de inibição e destruição do biofilme em placas de poliestireno da cepa padrão de *P. aeruginosa* (PA01) e o efeito sinérgico foi obtido com todos os fármacos associados, demonstrando um efeito potencializador do Citrato de Sildenafil. Desta forma, foi evidenciado que o fármaco é promissor na utilização para o combate a *P. aeruginosa*, uma vez que esta bactéria é considerada comum em pacientes hospitalizados, principalmente os internados em Unidades de Terapia Intensiva (UTI's), evidenciando assim um grande achado clínico.

REFERÊNCIAS

- [1] H. Xue, J. Li, H. Xie, Y. Wang, Review of drug repositioning approaches and resources, *Int. J. Biol. Sci.* 14 (2018) 1232–1244. <https://doi.org/10.7150/ijbs.24612>.
- [2] M. Cristina, T. Duarte, G.M. Figueira, A. Sartoratto, L. Vera, G. Rehder, C. Delarmelina, Anti- *Candida* activity of Brazilian medicinal plants, 97 (2005) 305–311. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2004.11.016>.
- [3] A.J. Bella, L.X. Deyoung, G.B. Brock, Daily Administration of Phosphodiesterase Type 5 Inhibitors for Urological and Nonurological Indications, 52 (2007) 990–1005. <https://doi.org/10.1016/j.eururo.2007.06.048>.
- [4] C. Jackson, A. Agboke, V. Nwoke, In vitro evaluation of antimicrobial activity of combinations of nystatin and *Euphorbia hirta* leaf extract against *Candida albicans* by the checkerboard method, 3 (2009) 666–669.
- [5] D.S. Caixeta, T.H. Scarpa, D.F. Brugnera, D.O. Freire, E. Alves, L.R. De Abreu, R.H. Piccoli, Chemical sanitizers to control biofilms formed by two *Pseudomonas* species on stainless steel surface, *Food Sci. Technol.* 32 (2012) 142–150. <https://doi.org/10.1590/s0101-20612012005000008>.
- [6] S. Ekins, A.J. Williams, M.D. Krasowski, J.S. Freundlich, In silico repositioning of approved drugs for rare and neglected diseases, *Drug Discov. Today.* 16 (2011) 298–310. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2011.02.016>.
- [7] CLSI, Standard for Quality in Your Laboratory With CLSI, (2018). www.clsi.org.
- [8] P. Cordenonsi Bonez, V. Albertina Agertt, G. Guidolin Rossi, F. dos Santos Siqueira, J. Demétrio Siqueira, L. Lorenço Marques, G. Noe Manzoni de Oliveira, R. Christ Vianna Santos, M. Matiko Anraku de Campos, Sulfonamides complexed with metals as mycobacterial biofilms inhibitors, *J. Clin. Tuberc. Other Mycobact. Dis.* (2021) 100217. <https://doi.org/10.1016/j.jctube.2021.100217>.
- [9] T.A. de Assis, J.G. Vivas Miranda, F. de Brito Mota, R.F.S. Andrade, C.M.C. de Castilho, Geometria fractal: Propriedades e características de fractais ideais, *Rev. Bras. Ensino Fis.* 30 (2008). <https://doi.org/10.1590/s1806-11172008000200005>.
- [10] M.D. Johnson, C. MacDougall, L. Ostrosky-Zeichner, J.R. Perfect, J.H. Rex, Combination Antifungal Therapy, *Antimicrob. Agents Chemother.* 48 (2004) 693–715. <https://doi.org/10.1128/AAC.48.3.693-715.2004>.
- [11] U. Kumar, S.S. Gokhle, V. Sreenivas, S. Kaur, D. Misra, Prospective, open-label, uncontrolled pilot study to study safety and efficacy of sildenafil in systemic sclerosis-related pulmonary artery hypertension and cutaneous vascular complications, *Rheumatol. Int.* 33 (2013) 1047–1052. <https://doi.org/10.1007/s00296-012-2466-5>.
- [12] F.M. Millezi, M.O. Pereira, N.N. Batista, N. Camargos, I. Auad, M.D.G. Cardoso, R.H. Piccoli, Susceptibility of monospecies and dual-species biofilms of *staphylococcus aureus* and *escherichia coli* to essential oils, *J. Food Saf.* 32 (2012) 351–359. <https://doi.org/10.1111/j.1745-4565.2012.00387.x>.
- [13] C.R. Bonapace, J.A. Bosso, L. V. Friedrich, R.L. White, Comparison of methods of interpretation of checkerboard synergy testing, *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 44 (2002) 363–366. [https://doi.org/10.1016/S0732-8893\(02\)00473-X](https://doi.org/10.1016/S0732-8893(02)00473-X).
- [14] R. Kumar, P. Malla, M. Kumar, Advances in the design and discovery of drugs

- for the treatment of prostatic hyperplasia, (2013) 1013–1027.
- [15] U. Römling, C. Balsalobre, Biofilm infections, their resilience to therapy and innovative treatment strategies, *J. Intern. Med.* 272 (2012) 541–561. <https://doi.org/10.1111/joim.12004>.
- [16] E.E. Mann, D.J. Wozniak, Pseudomonas biofilm matrix composition and niche biology, *FEMS Microbiol. Rev.* 36 (2012) 893–916. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2011.00322.x>.
- [17] L.J. Rubin, D.B. Badesch, T.R. Fleming, N. Galiè, G. Simonneau, H.A. Ghofrani, M. Oakes, G. Layton, M. Serdarevic-Pehar, V. V. McLaughlin, R.J. Barst, Long-term treatment with sildenafil citrate in pulmonary arterial hypertension: The SUPER-2 study, *Chest.* 140 (2011) 1274–1283. <https://doi.org/10.1378/chest.10-0969>.
- [18] U. Jenal, A. Reinders, C. Lori, Cyclic di-GMP: second messenger extraordinaire, *Nat. Publ. Gr.* (2017). <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2016.190>.
- [19] M. Zych, A. Roszczyk, M. Kniotek, B. Kaleta, R. Zagozdzon, Sildenafil Citrate Influences Production of TNF- α in Healthy Men Lymphocytes, *J. Immunol. Res.* 2019 (2019). <https://doi.org/10.1155/2019/8478750>.

5 Discussão

Citrato de Sildenafil, fármaco inibidor potente e seletivo da fosfodiesterase-5 (PDE5), exemplar de reposicionamento farmacológico, aprovado para uso terapêutico na disfunção erétil e, atualmente, no tratamento da hipertensão pulmonar, possuindo uma eficácia e uma segurança em seu uso já comprovada (KUMAR et al., 2013). Com o uso contínuo do medicamento, houve pacientes que observaram que seu uso demonstrava um alívio dos sintomas do trato urinário inferior (STUI) e mostrou-se eficaz na terapêutica em doenças inflamatórias crônicas, como a disfunção endotelial, colite (que consiste em uma reação inflamatória localizada no cólon, geralmente infecciosa ou autoimune), doenças neuroinflamatórias, como também doenças no trato geniturinário que apresentam uma morbidade mais frequente em homens acima de 50 anos (MILLEZI et al., 2012).

A relação do Citrato de Sildenafil com o tratamento de doenças infecciosas, desperta interesse, tendo em vista que atualmente, devido ao tratamento de infecções estar em escassez devido à resistência antimicrobiana e pela formação de estruturas que aumentam essa resistência, o reposicionamento do fármaco tem se tornado uma vantajosa alternativa. Diante disso, este estudo optou por realizar testes frente ao patógeno de origem oportunista *Pseudomonas aeruginosa*, ao qual é comumente conhecida como potencial formadora de biofilme, buscamos avaliar a atividade antimicrobiana e antibiofilme do Citrato de Sildenafil frente a PA01 e 10 diferentes isolados clínicos.

Neste contexto, a formação de biofilmes por estirpes de *P. aeruginosa* é relatada em vários casos infecciosos crônicos em humanos, como infecções de feridas crônicas, otites, prostatites, infecções do trato urinário e infecções relacionadas a dispositivos médicos, tais como cateteres intravenosos e válvulas cardíacas (FREITAS et al., 2010). Estas infecções são geradas principalmente pela adesão de microrganismos em comunidades multicelulares, os biofilmes, que provocam infecções que persistem e progridem no organismo mesmo com o tratamento. Desta forma, a formação do biofilme nos patógenos torna-se um fator de virulência que causa o agravamento da infecção e conseqüentemente aumenta a resistência aos tratamentos com antibióticos (SANTOS, 2004).

Relacionando o mecanismo de ação do Citrato de Sildenafil, que tem como alvo inibir a enzima 5PDE, essa, que hidrolisa a guanosina monofosfato cíclica (cGMP) para GMP e cAMP para AMP. Com o bloqueio da 5PDE resulta em concentração aumentada de cGMP celular, principalmente nas células do músculo liso dos vasos pulmonares, resultando conseqüentemente no seu relaxamento, enzima que interage com proteína quinase G (PKG) levando à ativação do canal iônico condutância, apoptose celular e glicogenólise. Em doentes com hipertensão arterial pulmonar, este efeito pode conduzir à vasodilatação seletiva do leito vascular pulmonar, e num menor grau, a uma vasodilatação na circulação sistêmica. A enzima PDE5 é amplamente distribuída entre vários tipos de células, por exemplo, vias aéreas células do músculo liso, células do músculo liso vascular, epitelial células e fibroblastos, bem como plaquetas e monócitos (RUBIN et al., 2011; BLOUNT et al., 2007).

Com isso, estudos mostram que o uso dos inibidores de PDE5, o citrato de sildenafil, o tadalafil e outros fármacos, competem com o GMPc pelo sítio catalítico da enzima. Mostrando em estudos recentes que os usos diários destes fármacos resultam na melhora do quadro clínico da prostatite crônica, como a hiperplasia prostática benigna, possuindo assim um potencial anti-inflamatório, deva-se a isso possivelmente ao efeito relaxante da musculatura lisa da uretra, como também no efeito anti-inflamatório por causa aos níveis de GMPc aumentados. Esta melhora clínica da hiperplasia prostática benigna, como também nos sintomas do trato urinário inferior, que foi propiciada pelo fármaco Citrato de Sildenafil tem sido associada então ao aumento dos níveis de GMPc (BLOUNT et al., 2007; CORBIN et al., 2003).

Nos microrganismos a c-di-AMP está envolvida em importantes processos biológicos e comportamento celular, incluindo como as bactérias coordenam seu próprio ciclo de crescimento e replicação, como eles se adaptam às superfícies formando consórcios multicelulares conhecidos como biofilmes, ou como são patogênicos bactérias controlam sua virulência e persistência. Como também, PDEs são encontrados em membros de todos os principais filos bacterianos, representando assim uma das maiores famílias conhecidas de proteínas de sinalização no reino bacteriano. Tendo em vista que o Citratato de Sildenafil age no processo de hidrolização da cGMP, sugerimos que a atividade antimicrobiana e

antibiofilme pode estar relacionada a este mecanismo (JENAL et al., 2017; ZYCH et al., 2019).

Para a avaliação de associação farmacológica, os testes foram realizados através do método *checkerboard*, resultando no efeito sinérgico do Citrato de Sildenafil frente aos fármacos antimicrobianos que são amplamente utilizados na prática clínica. Observamos quando o tratamento com o Citrato de Sildenafil é realizado em conjunto com antimicrobianos, ocorre um feito de sinergismo, ou seja, resulta em uma ação maior que seus efeitos quando utilizados de forma separada (BONAPACE et al., 2002). Através destes resultados é possível afirmar um potencial benéfico para a associação dos antimicrobianos testados, [®], Imipenem com o sildenafil, no tratamento frente a cepa padrão de *P. aeruginosa*. No entanto, se faz necessário avaliar mais IC isoladamente, pois cada isolado pode conter um mecanismo de resistência específico, para que com isso possa ser identificado um resultado sinérgico mais abrangente.

Como o número de estudos recém-aprovados para novos antibióticos diminuiu significativamente na última década, houve um aumento no número de bactérias resistentes aos medicamentos já existentes. Apesar da necessidade de pesquisas mais aprofundadas, podemos sugerir que o Citrato de Sildenafil pode ser uma promissora estratégia de tratamento para infecções bacterianas, tendo em vista a abordagem rápida e com uma terapêutica eficaz em combinações sinérgicas usando medicamentos aprovados.

|

6 Conclusão

Com os objetivos propostos neste estudo e os resultados experimentais obtidos, podemos concluir que:

- FÁRMACO Citrato de Sildenafil demonstrou atividade antimicrobiana e bactericida frente a *P. aeruginosa* (PA01) e os 10 IC;
- Obteve efeito de inibição e destruição da formação do biofilme frente a *P. aeruginosa* (PA01) e os 10 IC;
- Através da microscopia de força atômica (MFA) foi confirmada a ação de inibição e destruição do biofilme em placas de poliestireno da cepa padrão de *P. aeruginosa* (PA01);
- Efeito sinérgico foi obtido com todos os fármacos associados, demonstrando um efeito potencializador do Citrato de Sildenafil.

REFERÊNCIAS

- ANDRADE, S.S.; JONES, R.N.; GALES, A.C. Increasing prevalence of antimicrobial resistance among *Pseudomonas aeruginosa* isolates in Latin American medical centres: 5 year report of the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. **J Antimicrob Chemother.** 2003.
- BĂLĂȘOIU, M. et al. *Pseudomonas aeruginosa* resistance phenotypes and phenotypic highlighting methods. **Current Health Sciences Journal.** 2014.
- BELLA, A.J.; DEYOUNG, L.X.; AL-NUMI, M.; BROCK, G.B. Daily Administration of Phosphodiesterase Type 5 Inhibitors for Urological and Nonurological Indications. **European Urology.** 2007.
- BHARDWAJ, A. K.; VINOCHKUMAR, K.; RAJPARA, N. Bacterial Quorum Sensing Inhibitors: Attractive Alternatives for Control of Infectious Pathogens Showing Multiple Drug Resistance. **Recent Patents on Anti-Infective Drug Discovery.** 2013.
- BIELECKI, P. et al. Towards understanding *Pseudomonas aeruginosa* burn wound infections by profiling gene expression. **Biotechnol Lett.** 2008.
- BLOUNT, M.A.; ZORAGHI, R.; BESSAY, E.P.; BEASLEY, A.; FRANCIS, S.H.; CORBIN, J.D. Conversion of phosphodiesterase-5 (PDE5) catalytic site to higher affinity by PDE5 inhibitors. **J. Pharmacol. Exp. Ther.** 2007.
- BOGINO, P. C. et al. The Role of Bacterial Biofilms and Surface Components in Plant-Bacterial Associations. **International Journal of Molecular Sciences.** 2013.
- BORGES, A. et al. Evaluation of the effects of selected phytochemicals on quorum sensing inhibition and in vitro cytotoxicity. **Biofouling.** 2014.
- BRASIL, Ministério da Saúde, Agência Nacional de Vigilância Sanitária, Resolução RDC Nº 31, de 29 de maio de 2019. Dispõe sobre a realização dos Estudos de Equivalência Farmacêutica e Perfil de dissolução Comparativo. **Diário Oficial da União.** Brasília. 2014.
- BRASIL, Ministério da Saúde, Agência Nacional de Vigilância Sanitária, Resolução RDC Nº 31, de 11 de agosto de 2010. Dispõe sobre a realização dos Estudos de Equivalência Farmacêutica e Perfil de dissolução Comparativo. **Diário Oficial da União,** Brasília, 12 de agosto de 2010.
- BRASIL. Farmacopéia Brasileira, volume 1, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Brasília, **Anvisa,** 2010.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Políticas de Saúde. Departamento de Atenção Básica. **Política Nacional de Medicamentos.** 2001.
- BRECKENRIDGE, A.; JACOB, R. Overcoming the legal and regulatory barriers to drug repurposing. **Nature Reviews Drug Discovery.** 2018.

BUNACIU, A.A.; NASHAR, R.M.; ABOUL-ENEIN, H.Y. Mini review: determination of sildenafil citrate in pharmaceutical preparations. **Analytical Letters**. 2011.

CADIRCI, E. et al. Sildenafil treatment attenuates lung and kidney injury due to overproduction of oxidant activity in a rat model of sepsis: a biochemical and histopathological study. **Clinical & Experimental Immunology**. 2011.

CAIXETA, D. S. et al. Chemical sanitizers to control biofilms formed by two *Pseudomonas* species on stainless steel surface. **Food Science and Technology**. 2012.

CARPENTIER, B.; CERF, O. Review e persistence of *Listeria monocytogenes* in food industry equipment and premises. **International Journal of Food Microbiology**. 2011.

Cloridrato de Cefepima. Sumaré – SP: ABL Antibióticos do Brasil, 1999. Bula de remédio.

CLSI. Manual Clinical and Laboratory Standards Institute. Reference methods for broth dilution antifungal susceptibility tests for yeasts; approved standards, **CLSI document M27-A3**, 2018.

CORBIN, J.D.; BLOUNT, M.A., WEEKS, J.L.; BEASLEY, A.; KUHN, K.P.; HO, Y.S.J.; SAIDI, L.F.; HURLEY, J.H.; KOTERA, J.; FRANCIS, S.H. Sildenafil binding to phosphodiesterase-5 is specific, kinetically heterogeneous, and stimulated by cGMP. **Mol. Pharmacol**. 2003.

COSTERTON, W.; VEEH, R. The application of biofilm science to the study and control of chronic bacterial infections. **Journal of clinical**. 2003.

DONLAN, R. M.; COSTERTON, J. W. Biofilms: Survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. **Clinical Microbiology Reviews**. 2002.

DUARTE, M.C.T.; FIGUEIRA, G.M.; SARTORATTO, A.; REHDER, V.L.G.; DELARMELENA, C. Anti-Candida activity of Brazilian medicinal plants. **Journal of Ethnopharmacology**. 2005.

ESTRELA, T. S. Resistência antimicrobiana: enfoque multilateral e resposta brasileira. **Saúde e Política externa: os 20 anos da Assessoria de Assuntos Internacionais de Saúde (1998-2018)**. 2018.

EKINS, S.; WILLIAMS, A.J.; KRASOWSKI, M.D. & FREUNDLICH, J.S. In silicorepositioning of approved drugs for rare and neglected diseases. **Drug Discov Today**. 2011.

FARMACOPEIA BRASILEIRA 6ed. Brasília. Insumos Farmacêuticos e Especialidades. **ANVISA**. 2019. Vol. II.

FERNANDEZ-CUENCAA, F. et.al. In vitro Activity of Azithromycin in Combination with Amikacin, Ceftazidime, Ciprofloxacin or Imipenem against Clinical Isolates of *Acinetobacter baumannii*. **Microbiology**. 2003.

FLEMMING, H.C.; WINGENDER, J. The biofilm matrix. **Nat. Rev. Microbiol.** 2010.

FREITAS, V.R., VAN DER SAND, S.T.; SIMONETTI, A.B. In vitro biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* on the surface of high-speed dental handpieces. **Rev Odontol UNESP**. 2010.

FRIES, R.; KAVEH, S.; HUBERTUS, V. W. & MICHAEL, B. Sildenafil in the treatment of Raynaud's phenomenon resistant to vasodilatory therapy. **Circulation**. 2005.

GALIÈ, S.; GARCÍA G. C.; MIGUÉLEZ, E. M.; VILLAR, C. J.; LOMBÓ, F. Biofilms in the food industry: health aspects and control methods. **Frontiers in microbiology**. 2018.

GARNETT, J. A.; MATTHEWS, S. Interactions in bacterial biofilm development: A structural perspective. **Current Protein and Peptide Science**. 2013.

GHOFRANI, H.A.; OSTERLOH, I.H.; GRIMMINGER, F. Sildenafil: from angina to erectile dysfunction to pulmonary hypertension and beyond. **Nature Reviews Drug Discovery**. 2006.

GHOFRANI, H.A.; SCHERMULY, R.T.; ROSE, F.; WIDEMANN, R.; MARKUS, G.; KRECKEL, A. et al. Sildenafil for long-term treatment of nonoperable chronic thromboembolic pulmonary hypertension. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**. 2003.

GOKAKIN, A. K. et al. The protective effects of sildenafil in acute lung injury in a rat model of severe scald burn: A biochemical and histopathological study. **Burns**. 2013.

GOLD, H.S.; MOELLERING, R.C. JR. *Antimicrobial-Drug Resistance*. **The New England Journal of Medicine**. 1996.

GOLDSTEIN, I. et al. - The Serendipitous Story of Sildenafil: An Unexpected Oral Therapy for Erectile Dysfunction. **Sexual Medicine Reviews**. 2019.

GUPTA, S. et al. Temporal expression profiling identifies pathways mediating effect of causal variant on phenotype. **PLoS Genet**. 2015.

HEMNES, A. R.; ZAIMAN, A.; CHAMPION, H. C. PDE5A inhibition attenuates bleomycin-induced pulmonary fibrosis and pulmonary hypertension through inhibition of ROS generation and RhoA/Rho kinase activation. **The American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology**. 2008.

HOIBY, N. et al. ESCMID guideline for the diagnosis and treatment of biofilm infections. **Clinical and Microbiology Infection**. 2014.

HOIBY, N. et al., O. Antibiotic resistance of bacterial biofilms. **Int. J. Antimicrob. Agents.** 2010.

Imipenem Monoidratado e Cilastatina Sódica. Cosmópolis – SP, 1999. Bula de remédio.

JACKSON, C.; AGBOKE, A.; VICTOR NWOKE, V. *In vitro* evaluation of antimicrobial activity of combinations of nystatin and *Euphorbia hirta* leaf extract against *Candida albicans* by the checkerboard method. **Journal of Medicinal Plants Research.** 2009.

JAVARONI, V.; OIGMAN, W.; NEVES, M. Hipertensão Arterial e disfunção erétil. **Revista da Hospital Universitário Pedro Ernesto.** 2011.

JAY, J.M. Modern food microbiology. **Food Science & Nutrition.** 5th ed. New York: Chapman & Hall; 1996. p. 661.

KIFFER, C.; HSIUNG, A.; OPLUSTIL C ET AL - Antimicrobial susceptibility of Gramnegative bacteria in Brazilian hospitals: the MYSTYC Program Brazil 2003. **Braz J Infect Dis.** 2005.

KIM, E.; LEE, S.Y.; JEON, J.; KIM, Y.; PARK, S.J.; LEE, J.; KIM, J. Pharmacokinetics of a new orally soluble film formulation of sildenafil administered without water. **International Journal of Clinical Pharmacology and Therapeutics.** 2014.

LEWIS, K. Programmed death in bacteria. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.** 2007.

LOS WEINERT, P.; PEZZA, L.; PEZZA, H. R. Spectrophotometric determination of sildenafil citrate in pharmaceutical formulations. **Quimica Nova.** 2008.

MACEDO, A.J.; ABRAHAM, W.R. Can infections biofilm be controlled by blocking 373 bacterial communication? **Medicinal Chemistry.** 2009.

MAH, T. F. C.; O'TOOLE, G. A. Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. **Trends in Microbiology.** 2001.

MARGOTTO, P.R. Uso do Sildenafil (Viagra[®]) na hipertensão pulmonar persistente do recém-nascido. **MEDLINE.** 2004.

MASCARO, V. et. al. Prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) carriage and pattern of antibiotic resistance among sheep farmers from Southern Italy. **Infection and Drug Resistance.** 2019.

MAUNDERS, E.; WELCH, M. Matrix exopolysaccharides; the sticky side of biofilm formation FEMS. **Microbiology Letters.** 2017.

MICHELAKIS, E.D.; TYMCHAK, W.; NOGA, M.; WEBSTER, L.; WU, X.C.; LIEN, D.; et al. Long-term treatment with oral sildenafil is safe and improves capacity and hemodynamics in patients with pulmonary arterial hypertension. **Circulation.** 2003.

MILLEZI, F. M.; et al. Susceptibility of mono species and dual-species biofilms of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* to essential oils. **Journal of Food Safety**. 2012.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Políticas de Saúde. Departamento de Atenção Básica. Brasília: **Ministério da Saúde**. 2002.

MOLINA, J.; LUCCERO, E.; LULUAGA, S.; BELLONIO, V.; SPINDLER, A. & BERMAN, A. Systemic lupus erythematosus associated with pulmonary hypertension: good outcome following sildenafil therapy. **Lupus**. 2003.

MOTA, L. M. et al. Uso racional de antimicrobianos. **Medicina** (Ribeirão Preto). 2010.

NCCLS. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Methods for determining bactericidal activity of antimicrobial agents: Approved guideline M26-A. USA, 2018.

NEVES, P.R. et al. *Pseudomonas aeruginosa* multirresistente: um problema endêmico no Brasil. **J Bras Med Lab**. 2011.

O'NEILL, J. Tackling drug-resistant infections globally: final report and recommendation. **Review on antimicrobial resistance**. 2016.

OLIVEIRA, E.C. & AMARAL, C.F. Sildenafil no tratamento da hipertensão arterial pulmonar idiopática em crianças e adolescentes. **Jornal de Pediatria (Rio de Janeiro)**. 2005.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE (OMS). A crescente ameaça da resistência antimicrobiana: opções de ação. p. 1-14, 2012. Disponível em: http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/75389/3/OMS_IER_PSP_2012.2_por.pdf?ua=1. Acesso em: 28 de novembro de 2020.

POLAMREDDY, P.; GATTU, N. The drug repurposing landscape from 2012 to 2017: evolution, challenges, and possible solutions. **Drug Discovery Today**. 2018.

RÖMLING, U. et al. Biofilm infections, their resilience to therapy and innovative treatment strategies. **Journal of Internal Medicine**. 2012.

ROSSI, F. The Challenger of Antimicrobial Resistance in Brazil. **Antimicrob Resist**. 2011.

RUBIN, L. J., et al. Long-Term Treatment with Sildenafil Citrate in Pulmonary Arterial Hypertension: SUPER-2. **Source University of California at San Diego**, La Jolla, CA. v. 5, p. 139, 2011.

RYBTKE, M. et al. *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm Infections: Community Structure, Antimicrobial Tolerance and Immune Response. **J Mol Biol**. 2015.

QUEIROZ, N. S. A Resistência Bacteriana no Contexto da Infecção Hospitalar. **Texto & Contexto Enfermagem**. 2004.

SANTOS, N.D.Q. A Resistência Bacteriana no contexto da Infecção Hospitalar. **Rev. Texto e Contexto Enferm**. 2004.

SELEZSKA, K. et al. Pseudomonas aeruginosa population structure revisited under environmental focus: Impact of water quality and phage pressure. **Environmental Microbiology**. 2012.

SHARMA, G. et al. Pseudomonas aeruginosa biofilm: Potential therapeutic targets. **Biologicals**. 2014.

SINGH, S. et al. Understanding the Mechanism of Bacterial Biofilms Resistance to Antimicrobial Agents. **The Open Microbiology Journal**. 2017.

SOCAŁA, K. et al. Effect of sildenafil on the activity of some antidepressant drugs and electroconvulsive shock treatment in the forced swim test in mice Naunyn-Schmiedeberg's. **Archives of Pharmacology**, 2017.

STEERS, W.; GUAY, A.T.; LERICHE, A.; GINGELL, C.; HARGREAVE, T. B.; WRIGHT, P. J.; PRICE, D. E. & FELDMAN, R. A. Assessment of the efficacy and safety of viagra® (sildenafil citrate) in men with erectile dysfunction. **International Journal of impote research**. 2001.

Sulfato de Polimixina B. São Paulo: Eurofarma, 1999. Bula de remédio.

TEMPONE, A.G.; OLIVEIRA, C.M. & BERLINCK, R.G.S. Current approaches to discover marine antileishmanial natural products. **Planta Med**. 2011.

TORRES, L. O.; CUNHA, U.G.V.; LIMA, M. O. P. B. S.; MELLO, J.L.C. Sildenafil: eficácia, segurança e efeito sobre a pressão arterial postural em homens com 70 ou mais anos portadores de disfunção erétil. **Revista brasileira de medicina**. 2012.

UNITED STATES PHARMACOPEIA 36, vol. 2, sildenafil citrate, p. 5137-5138, 2013.

UTHAYATHAS, S. et al. Versatile effects of Sildenafil: recent pharmacological applications. **Pharmacological Research**. Kraków. 2007.

WALKER, J.; MOORE, G. Pseudomonas aeruginosa in hospital water systems: Biofilms, guidelines, and practicalities. **Journal of Hospital Infection**. 2014.

WANNMACHER, L. Uso indiscriminado de antibióticos e resistência microbiana: uma guerra perdida? **Uso racional de medicamentos: temas selecionados**. Brasília. 2004.

WATANABE, N., et al. Clinical efficacy of Sildenafil in interstitial pneumonia with pulmonary hypertension. **Nihon Kokyuki Gakkai Zasshi**. 2011.

WEINERT, P. L.; PEZZA, L.; PEZZA, H. R. Spectrophotometric determination of sildenafil citrate in pharmaceutical formulations. **Quimica Nova**. 2008.

WOOLHOUSE, M.; FARRAR, J. Policy: An intergovernmental panel on antimicrobial resistance. **Nature**. 2014.

WRIGHT, P. J. Comparison of phosphodiesterase type 5 (PDE5) inhibitors. **International Journal of Clinical Practice**. 2006.

XUE, H. et al. - Review of drug repositioning approaches and resources. **International Journal of Biological Sciences**. 2018.