



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA E MEDICINA LEGAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA MÉDICA**

BRUNO ROCHA AMANDO

**Impregnação de cateteres de Foley com clorpromazina para inibição de biofilmes
de bactérias e de leveduras uropatogênicas**

FORTALEZA-CE

2023

BRUNO ROCHA AMANDO

**Impregnação de cateteres de Foley com clorpromazina para inibição de biofilmes
de bactérias e de leveduras uropatogênicas**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Médica da Universidade Federal do Ceará, como requisito para obtenção do título de Doutor em Microbiologia Médica.
Área de concentração: Microbiologia Médica.

Orientador^a: Prof^a. Dr^a. Débora Castelo Branco de Souza Collares Maia.

FORTALEZA-CE

2023

BRUNO ROCHA AMANDO

**Impregnação de cateteres de Foley com clorpromazina para inibição de biofilmes
de bactérias e de leveduras uropatogênicas**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Médica da Universidade Federal do Ceará, como requisito para obtenção do título de Doutor em Microbiologia Médica.

Área de concentração: Microbiologia Médica.

Aprovada em: ___/___/_____.

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Débora Castelo Branco de Souza Collares Maia (Orientadora)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof^a. Dr^o. Felipe Piedade Goncalves Neves
Universidade Federal Fluminense (UFF)

Prof^a. Dr^a. Jaqueline Rabelo de Lima
Universidade Estadual do Ceará (UECE)

Prof^a. Dr^o. Saulo Relison Tintino
Universidade Regional do Cariri (URCA)

Prof^a. Dr^a. Vera Lucia Mores Rall
Universidade Estadual Paulista (UNESP)

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Sistema de Bibliotecas

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

- A498i Amando, Bruno Rocha.
Impregnação de cateteres de foley com clorpromazina para inibição de biofilmes de bactérias e de leveduras uropatogênicas / Bruno Rocha Amando. – 2023.
88 f. : il. color.
- Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas, Fortaleza, 2023.
Orientação: Profa. Dra. Débora Castelo Branco de Souza Collares Maia.
1. Biofilmes. 2. Bacilos Gram-Negativos Anaeróbios Facultativos. 3. Pseudomonas aeruginosa. 4. Candida sp.. 5. Clorpromazina. I. Título.

CDD 610

A Deus.

Aos meus pais, Amauri e Socorro.

À minha irmã Marília.

Ao meu noivo Andherson.

A todos meus amigos e colegas.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por ter me dado o dom da vida;

À Universidade Federal de Ceará, pela oportunidade e apoio ao longo dos anos.

Aos órgãos de fomento CAPES e FUNCAP por tornar possível o desenvolvimento dessa pesquisa.

À Prof^a. Dr^a. Débora Castelo Branco, por desde o início me guiar pelo melhor caminho para o aprendizado, por ter me recebido de braços abertos e por ter me dado a oportunidade de fazer parte do GrAMM. Por sempre me orientar de forma humana e humilde. Por ser esse exemplo de mulher, guerreira, trabalhadora e honesta.

À Prof^a. Dr^a. Gláucia Morgana, por toda a ajuda, conselhos e orientação ao longo do mestrado e doutorado.

Aos membros da banca de qualificação e de defesa por todas as considerações e contribuições feitas ao nosso projeto.

Aos meus pais, Amauri dos Santos Amando e Maria do Socorro Rocha Amando, por serem pais incríveis, por me mostrarem sempre o caminho certo a trilhar, me incentivando a ser uma pessoa do bem, determinada e focada nos meus objetivos.

Ao meu noivo e amor da minha vida, Andherson Estevam, por tornar minha vida mais leve, por ser meu porto seguro, onde posso descansar e me sentir acolhido, por estar comigo em todos os momentos, por apoiar todas as minhas escolhas e por sempre me incentivar a ser um ser humano melhor. Te amo Andherson.

À minha irmã e cunhada, Marília Rocha e Rachel Mola, por serem exemplos de hombridade, por sempre me apoiarem, me consolarem nos momentos difíceis da vida e vibrarem de alegria com minhas conquistas.

À toda a minha louca e amada família por ser a minha fortaleza, a razão para eu continuar lutando para crescer cada vez mais, em especial meu primo Murilo Campos, que tanto me ajuda com seus conselhos e a quem tanto me espelho.

Aos meus amigos do mestrado e doutorado, Carliane Melgarejo, Paulo Souza, Rodrigo Guedes, Vinicius Carvalho, Alyne Soares, Jaiane Brasil, Emanuela Araujo, Késia Veras, Vicente Melo, Raquel Colares, Fernando Monteiro e, em especial, ao Francisco Ivanilson, que me acompanhou em todos os experimentos, sendo um grande amigo, meu braço direito e parceiro durante todo o mestrado e doutorado.

A todos os meus colegas do PPGMM.

Aos meus amigos de Fortaleza por serem minha família aqui, por me apoiarem em todos os momentos, pela cumplicidade e união que só crescem.

Ao meu amigo, Odilon Blumetti, pela amizade, por todo companheirismo e confiança depositada em mim nesses 16 anos de amizade e parceria.

Aos meus amigos de Petrolina que mesmo distantes, estão sempre presentes em minha vida.

A todos os meus professores da faculdade, por terem ajudado a me preparar para o mundo profissional e por serem grandes exemplos de profissionais.

A todos os servidores do PPGMM por toda ajuda, auxílio e por todo suporte dado durante esse período de pesquisa e aprendizado.

“Descobrir consiste em olhar para o que
todo mundo está vendo e pensar uma
coisa diferente”

Roger von Oech

RESUMO

A infecção do trato urinário é uma das causas mais comuns de infecção na população geral, tanto na comunidade, quanto em ambiente hospitalar. O uso de cateteres de demora em pacientes hospitalizados torna esse tipo de infecção um problema de saúde pública mundial, responsável por cerca de 40% das Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde (IRAS) em todo mundo. As infecções do trato urinário associadas a cateter estão diretamente ligadas a formação de biofilmes nesses dispositivos. Dispositivos médicos impregnados com compostos com atividade antibiofilme podem ser estratégias de prevenção promissoras contra uropatógenos. A clorpromazina (CPZ), um antipsicótico que possui ação antimicrobiana já relatada na literatura, além de atuar como inibidor de bomba de efluxo e tem atividade antibiofilme. Dessa forma, o objetivo desse estudo foi avaliar o efeito *in vitro* da clorpromazina impregnada em cateteres sobre a formação de biofilmes por bacilos Gram negativos e *Candida* spp. associados a quadros de infecção do trato urinário. Foram selecionados 28 isolados, sendo 13 bacilos Gram negativos e 15 *Candida* spp. Os isolados foram avaliados quanto à sensibilidade à clorpromazina, na forma planctônica e séssil. Paralelamente os fragmentos de cateter foram impregnados em diferentes concentrações, sendo 200 µg/mL, 400 µg/mL e 600 µg/mL para os ensaios com bacilos Gram negativos e 400 µg/mL para os ensaios com *Candida* spp.. Após isso, foi avaliada a ação da clorpromazina sobre formação de biofilmes nesses fragmentos de cateter por meio da contagem de Unidade Formadora de Colônia (UFC)/mL e por microscopia confocal. Além disso, o efeito dos antimicrobianos, meropenem e ciprofloxacino contra os bacilos Gram negativos e fluconazol e caspofungina contra *Candida* spp. foi avaliado contra biofilmes crescidos em cateteres impregnados ou não com clorpromazina. A Clorpromazina apresentou CIMs entre 9,76 e 625 µg/mL para bactérias e CIMs entre 9,76 e 39,06 µg/mL para *Candida* spp. A CPZ foi capaz de inibir a formação de biofilmes *in vitro* de todas as espécies do estudo. Todas as concentrações da clorpromazina impregnada nos fragmentos de cateter inibiram a formação dos biofilmes, conforme demonstrado pela contagem de UFC e pela microscopia confocal. A concentração de 400 µg/mL apresentou a maior inibição na formação de biofilmes em fragmentos impregnados. O meropenem foi o único antimicrobiano do estudo que agiu de forma sinérgica com a clorpromazina, sobre biofilmes de bacilos Gram negativos crescidos em cateteres impregnados. Dessa forma, pode-se concluir que a clorpromazina na concentração de 400 µg/mL impregnada em fragmentos de cateteres inibe a formação de biofilmes por uropatógenos, representando uma potencial estratégia de prevenção de infecções do trato urinário associadas ao uso de dispositivos médicos.

Palavras-chave: Biofilmes; Bacilos Gram-Negativos Anaeróbios Facultativos; *Pseudomonas aeruginosa*; *Candida* sp.; Clorpromazina.

ABSTRACT

Urinary tract infection is one of the most common causes of infection in the general population, both in the community and in the hospital environment. The use of indwelling catheters in hospitalized patients makes this type of infection a global public health problem, responsible for about 40% of Healthcare-associated Infections (HAIs) worldwide. Catheter-associated urinary tract infections are directly linked to biofilm formation on these devices. Medical devices impregnated with compounds with antibiofilm activity may be promising prevention strategies against uropathogens. Chlorpromazine (CPZ), an antipsychotic that has antimicrobial action already reported in the literature, in addition to acting as an efflux pump inhibitor, has antibiofilm activity. Thus, the objective of this study was to evaluate the *in vitro* effect of chlorpromazine impregnated in catheters on the formation of biofilms by Gram-negative bacilli and *Candida* spp. associated with urinary tract infection. 28 isolates were selected, 13 Gram-negative bacilli and 15 *Candida* spp. The isolates were evaluated for sensitivity to chlorpromazine, in planktonic and sessile forms. In parallel, the catheter fragments were impregnated at different concentrations, 200 µg/mL, 400 µg/mL and 600 µg/mL for tests with Gram-negative bacilli and 400 µg/mL for tests with *Candida* spp.. After that, the action of chlorpromazine on the formation of biofilms in these catheter fragments was evaluated by means of the Colony Forming Unit (CFU)/mL count and by confocal microscopy. In addition, the effect of antimicrobials, meropenem and ciprofloxacin against Gram-negative bacilli and fluconazole and caspofungin against *Candida* spp. was evaluated against biofilms grown on catheters impregnated or not with chlorpromazine. Chlorpromazine showed MICs between 9.76 and 625 µg/mL for bacteria and MICs between 9.76 and 39.06 µg/mL for *Candida* spp. CPZ was able to inhibit the formation of biofilms, *in vitro*, of all studied species. All concentrations of chlorpromazine impregnated in catheter fragments inhibited the formation of biofilms, as demonstrated by CFU counts and confocal microscopy. The concentration of 400 µg/mL showed the greatest inhibition of biofilm formation in impregnated fragments. Meropenem was the only antimicrobial in the study that acted synergistically with chlorpromazine on Gram-negative bacillus biofilms grown in impregnated catheters. Thus, it can be concluded that chlorpromazine at a concentration of 400 µg/mL impregnated in fragments of catheters inhibits the formation of biofilms by uropathogens, representing a potential strategy for preventing urinary tract infections associated with the use of medical devices.

Keywords: Biofilms; Gram-Negative Facultatively Anaerobic Rods; *Pseudomonas aeruginosa*; *Candida* sp.; Chlorpromazine.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	Etapas da patogênese das infecções do trato urinário e infecção do trato urinário associado a cateter	21
Figura 2	Imagem ilustrativa de um cateter de Foley	22
Figura 3	Representação esquemática da formação do biofilme	31
Figura 4	Estrutura molecular da clorpromazina	35
Figura 5	Fluxograma utilizado na metodologia do estudo	39
Figura 6	Desenho esquemático para o teste de sensibilidade baseado no protocolo M27-A3 (CLSI, 2012) e M100, CLSI (2017)	43
Figura 7	Desenho esquemático para impregnação dos fragmentos de cateter com clorpromazina	46
Figura 8	Desenho esquemático da diluição das amostras submetidas a agitação para desprendimento do biofilme	49
Figura 9	Análise da microscopia confocal de biofilmes maduros da <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 29213 (PATCC) crescidos em cateteres impregnados com concentrações de 200, 400 ou 600 µg/mL de clorpromazina (CPZ). Controle de crescimento: fragmento de cateter não impregnado	65
Figura 10	Análise da microscopia confocal de biofilmes maduros da <i>Escherichia coli</i> enteroagregativa (EAEC) crescidos em cateteres impregnados com concentrações de 200 ou 600 µg/mL de clorpromazina (CPZ). Controle de crescimento: fragmento de cateter não impregnado	66
Figura 11	Análise da microscopia confocal de biofilmes maduros da <i>Proteus mirabilis</i> ATCC 29906 (PRAT) crescidos em cateteres impregnados com concentrações de 200 ou 600 µg/mL de clorpromazina (CPZ). Controle de crescimento: fragmento de cateter não impregnado	67
Figura 12	Análise da microscopia confocal de biofilmes maduros da <i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 600703 (KLaT) crescidos em cateteres impregnados com concentrações de 200 ou 600 µg/mL de	

clorpromazina (CPZ). Controle de crescimento: fragmento de cateter não impregnado 68

Figura 13 Biofilmes maduros de *Candida albicans*, *Candida krusei*, *Candida parapsilosis* e *Candida tropicalis* crescidos em fragmentos de cateteres impregnados com clorpromazina (CPZ) 69

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1	Ação da clorpromazina (CPZ) sobre a formação de biofilmes por <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (n=6). Dados expressos como média e desvio padrão da absorbância da biomassa, mensurada pela coloração com cristal violeta	54
Gráfico 2	Ação da clorpromazina (CPZ) sobre a formação de biofilmes por <i>Candida albicans</i> (n=4), <i>Candida tropicalis</i> (n=5), <i>Candida parapsilosis</i> (n=5) e <i>Candida krusei</i> (n=1). Dados expressos como média e desvio padrão da absorbância da biomassa, mensurada pela coloração com cristal violeta	54
Gráfico 3	Concentrações inibitórias mínimas (CIMs) e concentrações eliminatórias mínimas sobre o biofilme (CEMBs) da clorpromazina contra isolados de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (n=6)	55
Gráfico 4	Atividade metabólica dos biofilmes de <i>Candida</i> spp. (n=15) expostos a concentrações crescentes de clorpromazina (CPZ)	56
Gráfico 5	Atividade metabólica dos biofilmes de cada isolado de <i>Candida</i> spp. (n=15) expostos a concentrações crescentes de clorpromazina (CPZ). S50 indica redução na atividade metabólica em 50% ou mais dos biofilmes e S90 indica redução na atividade metabólica em 90% ou mais dos biofilmes	58
Gráfico 6	Efeito da impregnação de cateteres de Foley com clorpromazina (200 µg/mL; 400 µg/mL e 600 µg/mL) sobre a formação de biofilmes por <i>E. coli</i> , <i>K. pneumoniae</i> , <i>P. mirabilis</i> e <i>P. aeruginosa</i> . Dados expressos como média e desvio padrão de log da contagem de UFC/fragmento de cateter	59
Gráfico 7	Efeito da impregnação de cateteres de Foley com clorpromazina (CPZ a 200 µg/ mL e 600 µg/mL) sobre a formação de biofilmes por Enterobacteriaceae. Dados expressos como média e desvio padrão de log da contagem de UFC/cateter	60
Gráfico 8	Efeito da impregnação de cateteres de Foley com clorpromazina sobre a	

	formação de biofilmes por Enterobacteriaceae. a) <i>E. coli</i> com CPZ a 200, 400 e 600 µg/mL; b) <i>K. pneumoniae</i> com CPZ a 200, 400 e 600 µg/mL; c) <i>P. mirabilis</i> com CPZ a 200, 400 e 600 µg/mL. Dados expressos como média e desvio padrão de log da contagem de UFC/cateter	61
Gráfico 9	Efeito da impregnação de cateteres de Foley com clorpromazina (CPZ a 200 µg/mL, 400 µg/mL e 600 µg/mL) sobre a formação de biofilmes por <i>P. aeruginosa</i> . Dados expressos como média e desvio padrão de log da contagem de UFC/cateter	61
Gráfico 10	Efeito da impregnação de cateteres de Foley com clorpromazina sobre a formação de biofilmes por <i>Candida</i> spp. Dados expressos como média e desvio padrão de log da contagem de UFC/cateter	62
Gráfico 11	Efeito dos antimicrobianos ciprofloxacina (CIP) e meropenem (MER) em biofilmes maduros de <i>E. coli</i> (n=2), <i>K. pneumoniae</i> (n=3), <i>P. mirabilis</i> (n=2) e <i>P. aeruginosa</i> (n=2) crescidos sobre fragmentos de cateteres impregnados com clorpromazina (CPZ) a a) 200 µg/mL, b) 400 µg/mL e c) 600 µg/mL. Controle: fragmentos de cateter não impregnados. Dados expressos como média e desvio padrão de log da contagem de UFC/cateter	63
Gráfico 12	Efeito dos antifúngicos Fluconazol (FLC) e Caspofungina (CAS) sobre os biofilmes maduros de <i>Candida</i> spp. (n=7) crescidos em cateteres impregnados com clorpromazina (CPZ) a 400 µg/mL. Controle: fragmentos de cateter não impregnados. Dados expressos como média e desvio padrão da contagem de UFC/cateter	64
Gráfico 13	Análise da microscopia confocal de biofilmes maduros de <i>Candida albicans</i> , <i>Candida krusei</i> , <i>Candida parapsilosis</i> e <i>Candida tropicalis</i> crescidos em cateteres impregnados com clorpromazina (CPZ). Controle de crescimento: fragmento de cateter não impregnado	70

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Isolados selecionados para o estudo.....	41
Tabela 2	Determinação da concentração mínima inibitória (CIM) de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> e <i>Proteus mirabilis</i> associados a infecções do trato urinário a clorpromazina, ciprofloxacina e meropenem	52
Tabela 3	Determinação da concentração mínima inibitória (CIM) de <i>Candida albicans</i> , <i>Candida tropicalis</i> , <i>Candida parapsilosis</i> e <i>Candida krusei</i> a clorpromazina, fluconazol e caspofungina	53

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AIEC	Adherent-invasive <i>Escherichia coli</i>
AIs	Moléculas autoindutoras
ATCC	American Type Culture Collection
BHI	Brain Heart Infusion
C	Celsius
CEMB	Concentração eliminatória mínima em biofilme
CIM	Concentração inibitória mínima
CIMB	Concentração inibitória mínima em biofilme
CIP	Ciprofloxacina
CLSI	Clinical Laboratory Standards Institute
CLSM	Confocal Laser Scanning Microscopy
CMRVS	Coleção de Microrganismos de Referência em Vigilância Sanitária
CPZ	Clorpromazina
DAEC	Diffusely adherent <i>Escherichia coli</i>
DP	Desvio padrão
DO ₄₉₀	Densidade óptica 490 nm
EAEC	<i>Echerichia coli</i> enteroagregativa
EDS	Energy Dispersive Spectroscopy
EHEC	Enterohemorrhagic <i>Echerichia coli</i>
EIEC	Enteroinvasive <i>Echerichia coli</i>
EPEC	Enteropathogenic <i>Echerichia coli</i>
ETEC	Enterotoxigenic <i>Echerichia coli</i>
ExPEC	<i>Echerichia coli</i> extraintestinais
GrAMM	Grupo Aplicado em Microbiologia Médica
INCQS	Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde
InPEC	<i>Echerichia coli</i> intestinais
IRAS	Infecções relacionadas à assistência a saúde
ITU	Infecção do trato urinário
ITUAC	Infecção do trato urinário associado a cateter
KPC	Carbapenemases de <i>Klebsiella pneumoniae</i>
MER	Meropenem
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura

mg	Miligrama
MH	Mueller Hinton
mL	Mililitro
nm	Nanômetro
NMEC	Neonatal Meningitis <i>Escherichia coli</i>
PA	Pró análise
UFC	Unidade formadora de colônia
UPEC	<i>Echerichia coli</i>
µg	Micrograma
µL	Microlitro

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	18
2.1 Infecção do trato urinário	20
2.1.2 Infecção do trato urinário associada a cateter (ITUAC)	22
2.2 Microrganismos associados a infecção do trato urinário	24
2.2.1 <i>Escherichia coli</i>	24
2.2.2 <i>Proteus mirabilis</i>	25
2.2.3 <i>Klebsiella pneumoniae</i>	26
2.2.4 <i>Pseudomonas aeruginosa</i> associada a infecção do trato urinário	26
2.2.5 <i>Candida</i> spp. associadas a infecção do trato urinário	28
2.5 Biofilmes	30
2.5.1 Biofilmes associados a infecções de cateteres vesicais	32
2.6 Tratamento para ITUs	32
2.7 Inibidores de bomba de efluxo como agentes inibidores da formação de biofilmes	33
2.7.1 Clorpromazina	34
2.8 Impregnação ou revestimento de dispositivos biomédicos com antimicrobianos ou compostos antibiofilme	36
3 HIPÓTESES	37
4. OBJETIVO GERAL/ OBJETIVOS ESPECÍFICOS	37
4.1 Objetivo Geral	37
4.2 Objetivos específicos	37
5.1 Local do estudo	39
5.2 Microrganismos do estudo	39
5.3 Determinação das concentrações inibitórias mínimas (CIM) da clorpromazina e dos antimicrobianos contra isolados de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> e <i>Candida</i> spp.	41
5.3.1 Inóculos	42
5.3.2 Clorpromazina e antimicrobianos	42
5.3.3 Preparo da placa e ensaio	42
5.4 Análise da clorpromazina sobre a formação dos biofilmes por <i>Pseudomonas aeruginosa</i> e <i>Candida</i> spp.	44
5.5 CIMB e CEMB da clorpromazina dos isolados de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> e <i>Candida</i> spp.	45

5.6 Impregnação dos fragmentos de cateter com clorpromazina.....	46
5.7 Ação da clorpromazina, impregnados em fragmentos de cateter, sobre a formação de biofilmes dos isolados do estudo.....	47
5.7.1 Bactérias	47
5.7.2 Leveduras	48
5.7.3 Quantificação e leitura do ensaio	48
5.8 Avaliação da ação de antimicrobianos sobre biofilmes maduros dos isolados do estudo formados em fragmentos cateteres impregnados ou não com clorpromazina.....	49
5.9 Avaliação por microscopia confocal dos biofilmes, formados em fragmentos de cateteres impregnados com clorpromazina, de <i>E. coli</i> , <i>K. pneumoniae</i> , <i>P. mirabilis</i> , <i>P. aeruginosa</i> e <i>Candida</i> spp.....	50
5.10 Análise estatística.....	50
6.1 Determinação das concentrações inibitórias mínimas (CIM) da clorpromazina (CPZ) e dos antimicrobianos contra isolados de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> e <i>Candida</i> spp.....	52
6.2 Análise da clorpromazina sobre a formação dos biofilmes por <i>Pseudomonas aeruginosa</i> e <i>Candida</i> spp.....	53
6.3 CIMB e CEMB da clorpromazina dos isolados de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> e <i>Candida</i> spp.....	55
6.4 Impregnação dos fragmentos de cateter com clorpromazina e efeito da impregnação sobre a formação de biofilmes pelos isolados do estudo.....	59
6.5 Ação dos antimicrobianos sobre biofilmes maduros dos isolados do estudo formados em fragmentos cateteres impregnados com clorpromazina	62
6.6 Análise da microscopia confocal dos biofilmes dos isolados do estudo formados em fragmentos de cateteres impregnados com clorpromazina, combinados ou não com antimicrobianos.....	64
7. DISCUSSÃO	71
8. CONCLUSÕES	75
9. REFERÊNCIAS.....	76

1. INTRODUÇÃO

A infecção do trato urinário (ITU) é uma das causas mais comuns de infecção na população geral, podendo ocorrer em qualquer parte do sistema urinário, desde a uretra até os rins, mas é mais comum nas regiões mais externas do trato urinário, como uretra e bexiga. Além de ser muito comum em infecções comunitárias, a ITU é também uma das mais comuns relacionadas à assistência à saúde (IRAS), principalmente quando há o uso de dispositivos médicos invasivos.

O uso de cateteres de demora em pacientes hospitalizados torna a infecção do trato urinário associada ao uso de dispositivo médico responsável por cerca de 40% das IRAS em todo mundo, sendo um problema de saúde pública mundial, pois aumenta a taxa de morbidade e mortalidade, além de elevar os custos com a hospitalização. A causa das infecções do trato urinário associada a cateter (ITUACs) estão diretamente ligadas à formação de biofilmes microbianos nos dispositivos médicos, como o cateter de Foley.

Diversos são os microrganismos capazes de causar ITU, porém, o mais frequente é *Escherichia coli*, presente em mais da metade dos casos. Entretanto, outros microrganismos também estão bastante associados a ITU, principalmente em ambientes hospitalares, como *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Candida* sp., que por sua vez, vem aumentando a sua presença nesse tipo de infecção. Além dos fatores de virulência associados a cada espécie, eles possuem um mecanismo de resistência em comum, que é a capacidade de formar biofilmes.

Biofilmes são comunidades microbianas que se formam em superfícies diversas, como tecidos vivos, implantes e dispositivos médicos. Essas comunidades estão submersas em uma matriz extracelular composta de água, exopolissacarídeos, ácidos nucleicos, proteínas, carboidratos e moléculas autoindutoras (AIs). Essas moléculas compõem o sistema de *quorum sensing*, responsável por toda coordenação demográfica, expressão de genes de virulência, nutrição e dispersão do biofilme. Além disso, sabe-se hoje que cerca de 80% das infecções estão relacionadas com biofilmes, principalmente quando se trata de infecções crônicas.

Devido a isso, diversas estratégias vêm sendo desenvolvidas para combater e tratar tais infecções. A modulação do sistema *quorum sensing* têm sido alvo de muitas

pesquisas, pois já foi constatado que a interferência nesse sistema pode impedir que o biofilme se desenvolva ou pode modificar sua estrutura, tornando-o mais vulnerável à ação dos antimicrobianos. A utilização de extratos naturais ou o reposicionamento de fármacos que são empregados na clínica com outra finalidade, mas que possuem atividade antimicrobiana ou que agem de forma sinérgica e potencializam a ação de antibióticos vem sendo estudados como possíveis adjuvantes terapêuticos. Outra estratégia importante que vem sendo bastante estudada é a inibição de bombas de efluxo, pois essas são bastante expressas quando os microrganismos estão em biofilme e qualquer interferência no seu funcionamento causa modificações significativas na estrutura do biofilme, podendo favorecer a ação dos antimicrobianos.

Estudos *in vitro* que utilizaram dispositivos médicos impregnados ou revestidos com compostos que possuem ação antimicrobiana mostraram resultados promissores bastante eficazes contra uropatógenos. Dessa forma, o uso de compostos alternativos capazes de inibir bombas de efluxo e por consequência, interferir no *quorum sensing*, impedindo a formação de biofilmes e/ou deixando os microrganismos mais expostos à ação de antimicrobianos, pode ser uma estratégia eficaz para combater ITUACs. Nesse contexto, testamos a ação da clorpromazina, impregnados em cateteres de demora, para controlar a formação de biofilmes por uropatógenos.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Infecção do trato urinário

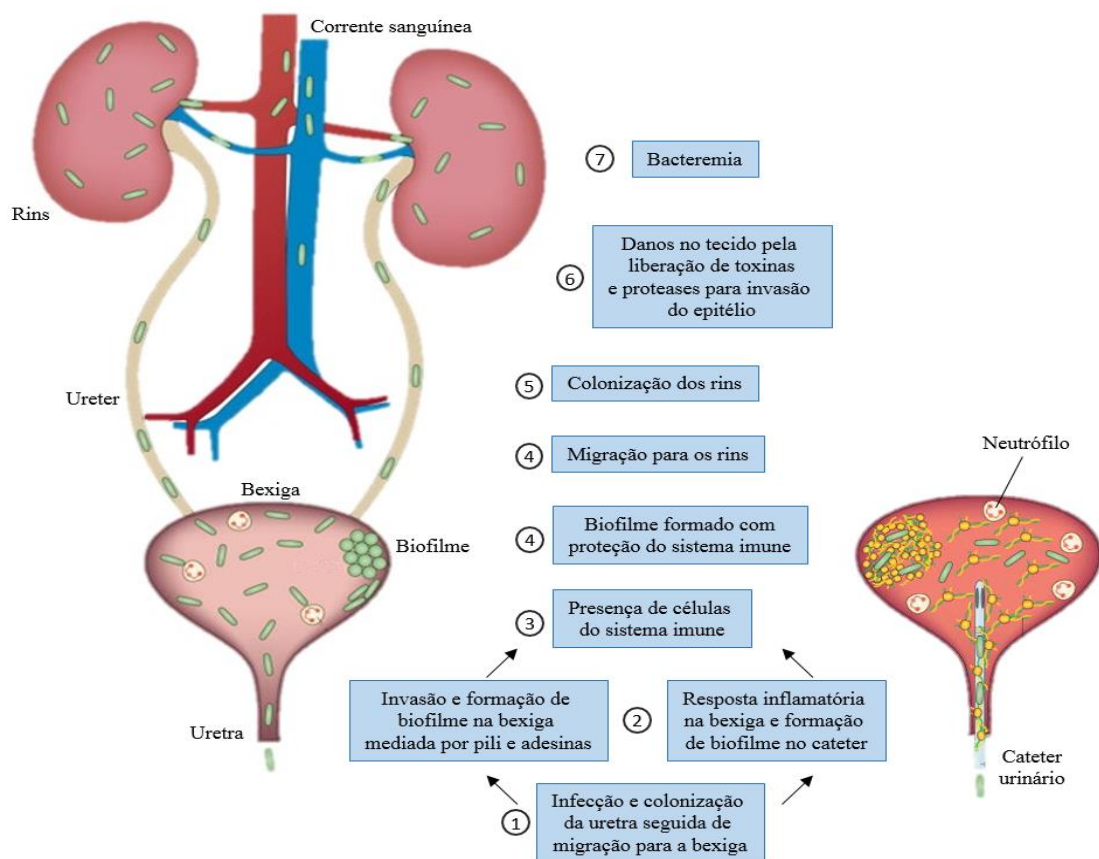
A infecção do trato urinário (ITU) é a colonização microbiana sintomática de alguma parte do trato urinário e está entre as doenças infecciosas mais comuns, tanto na comunidade, quanto em ambiente hospitalar (ROSHNIAMALARADJOU *et al.*, 2013; TAMADONFAR *et al.*, 2019). Por ser tratar de uma infecção comum, mais de 1,5 milhões de indivíduos são diagnosticados por ano, seja de ITU simples ou complicada, elevando os custos com a hospitalização, além de aumentar a morbidade e mortalidade (DAUTT-LEYVA *et al.*, 2018; ADEDZE-KPODO *et al.*, 2022).

O processo infeccioso ocorre quando microrganismos conseguem se instalar e se multiplicar de forma anormal na uretra, bexiga, ureteres ou rins fazendo com que a cultura da urina apresente um crescimento microbiano maior ou igual a 100.000 unidades formadoras de colônias (UFC)/mL (CHELKEBA *et al.*, 2022) (**Figura 1**). A incidência é maior em mulheres, por possuírem uma uretra mais curta, cerca de 05 centímetros, enquanto o homem tem em média de 15 a 20 centímetros. Com isso, as bactérias chegam mais facilmente até a bexiga. Além disso, a abertura a vagina situa-se próxima ao ânus, sítio anatômico com grande colonização de microrganismos (MAGLIANO *et al.*, 2012; MANSOURI *et al.*, 2019). Indivíduos acima dos 50 anos também estão mais propensos a ITUs, devido a fatores como, sistema imunológico debilitado, uso de medicamentos imunossupressores, menopausa em mulheres, prostatites em homens, e infecções assintomáticas recorrentes (AL-BADR; AL-SHAIKH, 2013; JESUS; COELHO; LUZ, 2018).

O indivíduo saudável possui diversos mecanismos de defesa que o protegem contra ITU's, como a própria micção, que expelle parte dessa colonização, a produção de mucopolissacarídeos e proteínas específicas, que atuam como inibidores de adesão microbiana, além do pH urinário que inibe a multiplicação desses microrganismos (SAINT; CHENOWETH, 2011, 2015). Dessa forma, o processo patológico ocorre quando a parte mais distal da uretra é infectada e, após isso, esse patógeno migra para regiões mais internas, como a bexiga, podendo chegar aos rins, onde pode romper a barreira epitelial, invadindo a corrente sanguínea, causando bacteremia e podendo evoluir para um quadro de sepse. Todo esse processo levará em consideração o fator patógeno-hospedeiro, pois os fatores de virulência, como flagelos, *pilis*, toxinas, proteases e formação de biofilmes podem auxiliar os patógenos na infecção, assim

como a imunidade do hospedeiro pode auxiliá-lo na defesa contra esses patógenos (FLORES-MIRELES *et al.*, 2015).

Figura 1. Etapas da patogênese das infecções do trato urinário e infecção do trato urinário associado a cateter.



Fonte: Modificado de FLORES-MIRELES *et al.*, 2015.

Quando o indivíduo faz uso de dispositivos médicos, como o cateter de alívio ou de demora, aumenta o risco de adquirir uma ITU, agora denominada de infecção do trato urinário associado a cateter (ITUAC) (HSUEH *et al.*, 2011). O processo de introdução do dispositivo médico pode carrear os microrganismos presentes na microbiota do indivíduo ou pela má antissepsia do profissional de saúde para a parte mais proximal da uretra e/ou diretamente para a bexiga (FLORES-MIRELES *et al.*, 2015), onde, irá se aderir com auxílio dos fatores de virulência *pili* e adesinas e, após isso, iniciará o processo de infiltração com neutrófilos. Os microrganismos formarão biofilmes no cateter e liberarão toxinas e proteases que causarão danos ao epitélio (HSUEH *et al.*, 2011; WERNEBURG, 2022). Dessa forma, as ITUs são uma das principais causas de infecções relacionadas à assistência à saúde (IRAS) em pacientes internados em unidades hospitalares, representando até 60% dos casos (DUDECK *et al.*,

2013; HSIAO *et al.*, 2015; MASSON *et al.*, 2009). Grande parte dos casos de ITUs em unidades hospitalares está associada ao uso de cateteres de alívio ou de demora e o risco de infecção aumenta entre 3% e 10%, de forma cumulativa, a cada dia com a permanência do cateter de demora (CHENOWETH, SAINT, 2011; HOOTON, 2010).

2.1.2 Infecção do trato urinário associada a cateter (ITUAC)

A utilização de dispositivos médicos é amplamente difundida em ambiente hospitalar, mais de 90 milhões de cateteres uretrais são vendidos em todo o mundo, anualmente. Com isso, a ITUAC é a mais comum entre as IRAS, correspondendo cerca de 40% dessas infecções (KLINE; LEWIS, 2016; RAJAKARUNA; HARBERM, 2014; SAINT; CHENOWETH, 2011). A utilização de cateteres vesicais de demora (**Figura 2**) configura um importante fator de risco para infecções em pacientes hospitalizados, elevando a taxa de morbidade e mortalidade associadas a ITUs. Embora a presença da bacteriúria não seja tratado como um preditor de morte e sim como um marcador de doença subjacente grave em pacientes cateterizados, estudos sugerem que as ITUACs representam um risco até três vezes maior de morte (PLATT *et al.*, 1982; SAINT; CHENOWETH, 2011).

Figura 2. Imagem ilustrativa de um cateter de Foley.



Fonte: Google imagens.

A necessidade de utilizar o cateter de demora em pacientes vai variar de acordo com a indicação médica e o tipo de paciente em questão. No mercado, existem diversos

tipos de cateteres vesicais, estes podem ser constituídos de látex, silicone e até uma combinação dos dois, além de poder ser de alívio ou de demora. A realização do procedimento é, de acordo com a resolução nº 450/2013, publicada pelo Conselho Federal de Enfermagem (COFEN), de responsabilidade dos enfermeiros (JESUS; COELHO; LUZ, 2018). A formação de biofilmes em cateteres urinários tem um importante papel nas ITUACs, pois está presente na maioria dos casos e representa um desafio no diagnóstico de ITUs e no tratamento dessas infecções (RAJAKARUNA; HARBERM, 2014).

De maneira geral, as enterobactérias são os patógenos mais comumente causadores desse tipo de infecção, representando cerca de 80% dos casos. Dentre eles, o microrganismo mais presente em ITUs é *E. coli*, seja em pacientes comunitários ou em pacientes hospitalizados (WERNEBURG, 2022). Dessa forma, *E. coli*, *P. mirabilis* e *K. pneumoniae* estão entre as bactérias Gram negativas mais frequentemente causadoras de ITUACs, porém, outros microrganismos importantes clinicamente também são muito presentes, como *P. aeruginosa*, os cocos Gram positivos e os fungos do gênero *Candida* (FLORES-MIRELES *et al.*, 2015; FOXMAN, 2010; FOXMAN *et al.*, 2014; KLINE *et al.*, 2011; KLINE; LEWIS, 2016; WERNEBURG, 2022).

Candida spp. vem, cada vez mais, se consolidando como um importante agente causador de ITUACs, representando cerca de 18% dos diagnósticos, porém, a patogênese dessas infecções ainda não está totalmente elucidada (FLORES-MIRELES; HREHA; HUNSTAD, 2019). Após 1980, as infecções causadas por fungos começaram a aumentar e causar uma grande preocupação na comunidade médica, principalmente envolvendo o trato urinário, da qual *C. albicans* é a espécie mais comumente isolada (ABI-SAID *et al.*, 1997).

Esse tipo de infecção é um problema de saúde pública mundial, principalmente pela dificuldade no tratamento. Além de que esses microrganismos hospitalares apresentam, muitas vezes, um elevado perfil de resistência a antimicrobianos, a superfície abiótica do dispositivo médico associada a formação de biofilme, impede ou reduz a penetração dos antimicrobianos, além do uso de antimicrobianos forçar uma pressão seletiva e modificar a microbiota dos pacientes, favorecendo a multiplicação desses isolados resistentes (WERNEBURG, 2022).

2.2 Microrganismos associados a infecção do trato urinário

Nos dois últimos séculos houve um avanço significativo na medicina, fazendo com que a expectativa da vida humana desse um salto, devido ao descobrimento dos antimicrobianos e ao desenvolvimento de drogas para tratamentos de doenças como o câncer, porém, em contrapartida, o desenvolvimento desses fármacos tornou o ser humano mais susceptível a infecções bacterianas e fúngicas (KÖHLER *et al.*, 2017; STRICKLAND; SHI, 2021). Além disso, as infecções fúngicas vêm aumentando, também, após o surgimento do HIV/Aids. São poucos os fungos que causam doenças em indivíduos saudáveis, inclusive, muitos deles estão presentes em nossa microbiota, como a espécie *Candida* spp. (KÖHLER *et al.*, 2017; STRICKLAND; SHI, 2021).

Por outro lado, os bacilos Gram-negativos (BGN) estão ligados a uma enorme variedade de infecções comunitárias e IRAS, principalmente quando se trata de ITUs, pois a maioria dessas infecções é causada por eles, como pode-se observar em diversos estudos a presença de microrganismos como *E. coli*, *K. pneumoniae*, *P. mirabilis* e *P. aeruginosa* causando ITU (AZAM; KHAN, 2019; FLORES-MIRELES *et al.*, 2015; LOGAN; WEINSTEIN, 2017). Muitas pesquisas indicam que a origem das bactérias causadoras de ITUs seja o intestino, além disso, ainda é correto afirmar que a microbiota intestinal pode interferir direta ou indiretamente na saúde de órgãos próximos ou distantes do corpo humano. Portanto, esse pode ser o motivo pelo qual é observada a presença constante da família Enterobacteriaceae nesse tipo de infecção, visto que seus membros estão em abundância no intestino humano (MEŠTROVIĆ *et al.*, 2020).

2.2.1 *Escherichia coli*

Escherichia coli é uma bactéria Gram negativa, bacilar, que originalmente foi descrita como *Bacterium coli commune*, por Theodor Escherich, no final do século XIX. Mais tarde, após sua morte, o nome da bactéria foi alterado para *E. coli* em homenagem a Escherich (DUNNE *et al.*, 2017).

E. coli contribuiu positivamente para o avanço da ciência e biotecnologia. Existe uma divergência entre autores sobre seu papel no organismo humano, enquanto uns pesquisadores relatam ela é como um comensal, pois se beneficia, enquanto o organismo não é afetado, mas também não recebe benefícios, outros pesquisadores relatam uma relação mutualística, visto que a *E. coli* inibi a colonização de outros

microrganismos, causando um controle populacional no intestino (LEATHAM *et al.*, 2009; SHAH *et al.*, 2019).

E. coli pode ser classificada em patotipos, de acordo com os fatores de virulência expressados pelos isolados, sendo classificadas em *E. coli* enteropatogênica (EPEC), enterohemorrágica (STEC), enteroagregativa (EAEC), enteroinvasiva (EIEC), enterotoxigênica (ETEC), difusa aderente (DAEC), aderente invasiva (AIEC) conhecidas como *E. coli* intestinais (InPEC) e *E. coli* patogênicas extraintestinais (ExPEC), que pode causar meningites neonatais (NMEC) e a uropatogênica (UPEC), muito presente em ITUs (GARCÍA; FOX, 2021; ROJAS-LOPEZ *et al.*, 2018). Os principais fatores de virulência associados as UPECs são as fímbrias, que promovem uma melhor adesão à superfície das células, além de ajudar na invasão tecidual e formação de biofilme (SHAH *et al.*, 2019).

2.2.2 *Proteus mirabilis*

Pertencente a classe *Gammaproteobacteria*, *P. mirabilis* é um bacilo Gram negativo membro da família *Morganellaceae*. Membro importante da microbiota intestinal, *P. mirabilis* tem a capacidade de se propagar do intestino para outros sítios anatômicos, principalmente o trato urinário, causando infecções leves ou graves, onde pode ser formado cálculos, tantos na bexiga, como nos rins, levando o paciente a ter uma pielonefrite ascendente ou até uma urosepse (NIEMIEC *et al.*, 2022).

Proteus mirabilis é conhecido pela sua alta capacidade de motilidade formando um véu na superfície de alguns meios de cultura. e está associado a casos graves de ITUs, principalmente relacionados a dispositivos médicos, pois possui uma alta capacidade de formar biofilmes nessas superfícies além de induzir a produção de cálculos renais com danos ao tecido renal, assim como cálculos na bexiga (ARMBRUSTER; MOBLEY; PEARSON, 2018). Além disso, *P. mirabilis* é comumente encontrado em biofilmes associado a outras bactérias, como *E. coli*, em ITUACs (JACOBSEN, SHIRTLIFF, 2011).

P. mirabilis possui diversos fatores de virulência que o torna bastante patogênico, com fímbrias, proteases, toxinas, bombas de efluxo do tipo I, III, IV, V e VI, além da capacidade de formar biofilmes, porém, a produção da urease é a mais conhecida entre todas e está diretamente ligada à formação de cálculos (urolitíase), pois a enzima participa da hidrólise da ureia, muito presente na urina, gerando amônia que

eleva o pH da urina fazendo com que ânions e cátions polivalentes precipitem formando cálculos de estruvita e carbonato de apatita (TORZEWSKA; RÓŻALSKI, 2015).

2.2.3 *Klebsiella pneumoniae*

Descrita pela primeira vez por Carl Friedlander, em 1882, *K. pneumoniae* é mais um bacilo Gram negativo encapsulado da família Enterobacteriaceae de extrema importância clínica, pois está presente em diversas infecções e vem ganhando cada vez mais notoriedade graças ao crescente aumento da resistência a antimicrobianos associados aos isolados dessa espécie. É possível constatar que muitos dos genes de resistência hoje descritos para vários microrganismos, foram relatados primeiramente em isolados de *K. pneumoniae*, como é o caso das carbapenemases do tipo KPC (BENGOECHEA; PESSOA, 2019; PODSCHUN *et al.*, 2001).

Além da *K. pneumoniae* possuir a capacidade de resistir a diversos tratamentos com antimicrobianos, como os casos das cepas multirresistentes, ainda existem isolados hipervirulentos, que possuem a capacidade de expressar diversos fatores de virulência que podem causar danos não hospedeiro. A sua cápsula de polissacarídeo, por exemplo, é um fator de virulência importante, pois impede a opsonização bacteriana e a fagocitose. Além disso, os lipopolissacarídeos (LPS) estão presente na estrutura da membrana externa de bactérias Gram-negativas, incluindo *K. pneumoniae*, com função importante para a formação do biofilme, pois auxilia na adesão inicial das bactérias as superfícies. A formação de biofilmes promove uma maior proteção contra estresses externos, assim como agrava a cronicidade das infecções, principalmente se estiver associada a uso de dispositivos médicos, como os casos de ITUACs (GUERRA *et al.*, 2022; WYRES *et al.*, 2016).

2.2.4 *Pseudomonas aeruginosa* associada a infecção do trato urinário

Pertencente à família Pseudomonadaceae, foi isolada por Carle Gessard em 1882, pela primeira vez, de feridas cutâneas de dois pacientes, *P. aeruginosa* é uma bactéria bacilar, Gram-negativa, aeróbia e positiva para motilidade, além disso, tem uma vasta capacidade de adaptação em diversos ambientes, seja ambientes externos como solo, água ou plantas, seja em ambientes hospitalares como equipamentos, dispositivos médicos, entre outros (AZAM; KHAN, 2019). É uma espécie oportunista de muita importância para a saúde, pois é extremamente patogênica e causa infecções e doenças tanto em animais, quanto em plantas, incluindo diversas doenças em humanos,

principalmente em ambiente hospitalar e em pacientes com algum imunocomprometimento, como pneumonias associadas à ventilação mecânica (PAV), infecções em unidades de terapia intensiva (UTI), infecções da corrente sanguínea, pacientes com fibrose cística, infecções de sítio cirúrgico, ITUs, infecções por queimaduras, ceratite e otite (JURADO-MARTÍN; SAINZ-MEJÍAS; MCCLEAN, 2021; TUON *et al.*, 2022).

P. aeruginosa possui um poderoso arsenal de fatores de virulência que a tornam um patógeno difícil de ser combatido (JURADO-MARTÍN; SAINZ-MEJÍAS; MCCLEAN, 2021). Dentre esses fatores de virulência, existem fatores estruturais, como os lipopolissacarídeos (LPS), as proteínas transmembranares, as estruturas flagelares, as *pilis* e as bombas de efluxo e fatores não estruturais, como a capacidade de formação de biofilmes, produção de sideróforos, proteases, elastases, fosfolipases e sistema de *quorum sensing* (JURADO-MARTÍN; SAINZ-MEJÍAS; MCCLEAN, 2021; MITTAL *et al.*, 2009).

Assim como em outras espécies, *P. aeruginosa* utiliza combinações de mecanismos para auxiliar sua ascensão na patogênese, um desses mecanismos é a formação de biofilmes. Em ITUACs, *P. aeruginosa* forma biofilmes em dispositivos médicos utilizando vários mecanismos, inclusive o *quorum sensing*, que sinaliza para síntese de alginato, componente mais importante dos biofilmes dessa espécie e modulando a hidrofobicidade da superfície. Porém, alguns outros exopolissacarídeos também fornecem uma função crucial na produção de biofilme de isolados não produtores de alginato. A formação de biofilmes corrobora com a cronicidade das infecções por *P. aeruginosa* (MITTAL *et al.*, 2009; RYDER; BYRD; WOZNIAK, 2007).

Além disso, outro fator de extrema importância para patogênese da *P. aeruginosa* e para sua elevada resistência aos tratamentos com antimicrobianos é a sua capacidade de super expressar bombas de efluxo, proteínas transmembranares que estão presentes na maioria das bactérias Gram negativas e que possuem funções fisiológicas importantes para esses microrganismos (SHIGEMURA *et al.*, 2015). Além das funções fisiológicas que essas bombas de efluxo possuem, elas também contribuem para o aumento da resistência a antimicrobianos, como o operon MexAB-OprM, codificado pelos genes *mexA*, *mexB* e *oprM*, que corrobora com a resistência a β -lactâmicos, tetraciclina e fluoroquinolonas e o operon MexCD-OprJ, codificado pelos genes *mexC*, *mexD* e *oprJ*, que corrobora com a resistência aos macrolídeos, tetraciclina,

fluoroquinolonas e também, a certos β -lactâmicos (LI; BARRÉ; POOLE, 2000; MORITA *et al.*, 2013).

2.2.5 *Candida spp. associadas a infecção do trato urinário*

Candida spp. é um gênero de fungos oportunistas, cujas infecções aumentaram de forma significativa nos últimos anos, principalmente em ambiente hospitalar, o que gera um grave problema de saúde pública (GAJDÁCS *et al.*, 2019). Por muito tempo as espécies de *Candida* foram denominadas como *Candida albicans* e não *albicans*, porém, apesar da *Candida albicans* ser a espécie mais relatada na literatura como patógeno fúngico mais associado a ITU, o cenário vem se modificando e outras espécies vem ganhando destaque, como *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis*, *Candida tropicalis* e, mais recentemente, *Candida auris* (DIAS, 2020; FAZELI *et al.*, 2019; GARCIA RIVERA, HEYL, OH, 2020). Em contrapartida, há relatos epidemiológicos na literatura que demonstram a diminuição das ITUs por bactérias e o aumento dessas infecções por fungos (BONGOMIN *et al.*, 2017; DIAS, 2020; FAZELI *et al.*, 2019).

As ITUs causadas por espécies de *Candida* são, na maioria dos casos, assintomáticas (POLONI; ROTTA, 2020). Uma grande questão que ainda necessita de elucidação é a definição de candidúria, pois na literatura pode ser encontrada algumas divergências, como, por exemplo, o critério para contagem de UFCs, que pode variar entre 10^3 a 10^5 UFC/mL, além de existir uma definição distinta de candidúria para homens e mulheres (ACHKAR; FRIES, 2010). Por outro lado, a ITU causada por *Candida spp.* pode ser acarretada por via ascendente, na qual as leveduras ascendem da parte mais externa do trato geniturinário para a bexiga e rins ou por via hematogênica, na qual, a levedura invade os túbulos proximais após passar pelos glomérulos e é eliminada pela urina (KAUFFMAN, 2014). A distinção clínica de ITU superior e inferior é difícil de ser diagnosticada, além disso, a utilização de dispositivos médicos, como cateter de Foley, representam um fator de risco para os pacientes, pois proporciona um ambiente propício para formação de biofilmes, o que leva dificuldade no tratamento e a cronicidade da infecção (GUTIERREZ-CUADRA; HORCAJADA; MARTINEZ, 2007; POLONI; ROTTA, 2020).

Presente na microbiota humana, principalmente no trato gastrointestinal, trato geniturinário, cavidade oral e pele, *C. albicans* é uma espécie fúngica que pode se apresentar de diversas formas, como leveduras, que possuem uma forma ovalada e se multiplica de forma assexuada, conhecida como brotamento. Além dessa forma

leveduriforme, *C. albicans* ainda pode se apresentar como pseudo-hifas e como hifas, formas que estão intrinsicamente ligadas ao aumento de temperatura, mudança de pH e aumento na concentração de CO₂ (LA BELLA *et al.*, 2023; NOBILE, JOHNSON, 2015).

Apesar de ser comensal, a *C. albicans* possui diversos fatores de virulência que auxiliam no processo de patogênese (PONDE *et al.*, 2021). Um dos fatores de virulência é o seu polimorfismo, a transição de levedura para pseudo-hifa e hifa indica a passagem de sua forma comensal para as formas patogênicas, pois as hifas possuem a capacidade de invadir o tecido do hospedeiro por penetração ativa e endocitose induzida (MAZA *et al.*, 2017). Além disso, essa espécie produz adesinas importantes para ligação e fixação em superfícies, proteínas essenciais para o processo de transformação de levedura em hifas, como a proteína quinase A, toxinas responsáveis por romper a membrana celular, como a candidalisina e ainda podem se organizar em biofilme (TALAPKO *et al.*, 2021).

Assim como em outros tipos de infecção, as infecções por *C. albicans* estão, em sua grande maioria, relacionadas a formação de biofilmes, seja no próprio hospedeiro ou em dispositivos médicos, como cateteres urinários, cateteres venosos centrais, marca-passos, válvulas cardíacas mecânicas e próteses articulares (TALAPKO *et al.*, 2021). Dentro desses biofilmes é possível encontrar todas as formas dessa espécie, fazendo com que eles sejam robustos e resistentes, facilitando infecções invasivas de tecidos e órgãos e podendo causar infecção na corrente sanguínea (NOBILE; JOHNSON, 2015). Além da antibioticoterapia, incluindo a de amplo espectro, ser um dos principais fatores de risco para candidíase disseminada, a formação de biofilmes em dispositivos médicos também causa grande preocupação, pois esse biofilme dificulta o tratamento com antifúngicos causando a cronicidade da infecção (LA BELLA *et al.*, 2023).

Um dos maiores desafios para o diagnóstico de leveduras em laboratórios é o custo atrelado a implementação dos fluxos de isolamento e identificação desses fungos (ACHKAR; FRIES, 2010). Muitos laboratórios não possuem metodologias que permitam a identificação e a realização de testes de sensibilidade a antifúngicos, fazendo com que seja utilizado, na maioria das vezes, meios de cultura seletivos e cromogênicos que favorecem mais o crescimento bacteriano e, como consequência, inibindo ou retardando o crescimento de algumas espécies fúngicas (POLONI; ROTTA, 2020). Estudos demonstraram que urinas semeadas em meio de cultura padrão para

fungos, o Ágar Sabouraud dextrose, obtiveram crescimento mais significativos de espécies de *Candida não-albicans* (ACHKAR; FRIES, 2010; OKULICZ, 2008).

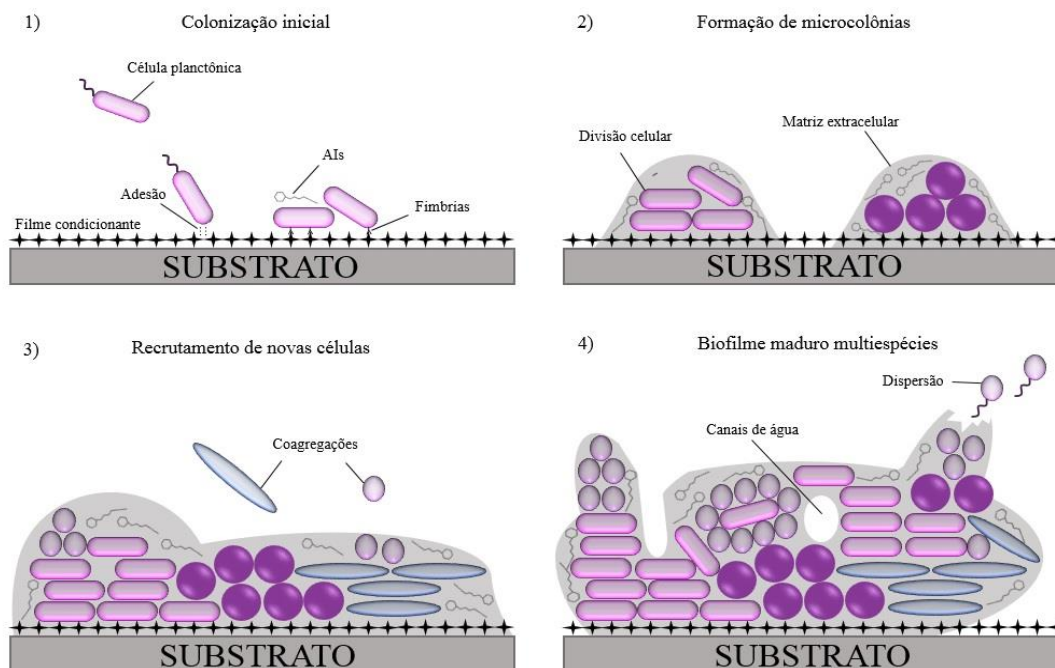
C. tropicalis aparece em grande destaque quando o assunto é ITU, pois ela está entre as principais leveduras patogênicas na América latina, ocupando o lugar da *C. albicans* em determinadas regiões (CHOI *et al.*, 2016).

2.5 Biofilmes

Os biofilmes microbianos foram desconhecidos por muitos anos, pois, durante o último século de pesquisa sobre microrganismos, de maneira geral, concentrou seus estudos acerca de um estilo de vida planctônico (BJARNSHOLT *et al.*, 2018). Apesar dessas pesquisas contribuírem fortemente para o avanço na medicina, aumentando exponencialmente a expectativa da vida humana, sabemos que os microrganismos possuem a capacidade de se agrupar em comunidades denominadas biofilme e que os primeiros relatos do que hoje chamamos de biofilmes foram descritos ainda por Anton Van Leeuwenhook (HØIBY, 2014).

Os biofilmes podem ser mono ou polimicrobianos, onde os microrganismos se organizam dentro de uma matriz de polissacarídeos e se comunicam utilizando um sistema especializado chamado de *quorum sensing* (ANJU *et al.*, 2022; NESSE, OSLAND, VESTBY, 2023). O *quorum sensing* tem o papel importante de determinar a formação, maturação, manutenção e dispersão dos biofilmes, através de moléculas autoindutoras (Ai's) que são secretadas por esses microrganismos a medida que se organizam em biofilme, além de proporcionar um ambiente favorável para troca de genes de resistência entre eles (**Figura 3**) (COSTERTON, 1984; SOLANO, ECHEVERZ, LASA, 2014).

Figura 3. Representação esquemática da formação do biofilme. (1) Adesão bacteriana mediada por forças de Van der Waals, fixação das células planctônicas na superfície, com auxílio das fímbrias e início da secreção de moléculas autoindutoras (AIs) responsáveis pelo *quorum sensing*; (2) Divisão celular e início da excreção de matriz extracelular polimérica, formando as microcolônias; (3) Recrutamento de novas células, da mesma espécie e de outras, para aumento da densidade do biofilme e mais produção de matriz extracelular polimérica para o amadurecimento do biofilme; (4) Biofilme maduro com canais de água e início da dispersão de algumas células para colonização de novos sítios.



Fonte: Modificado de RICKARD *et al.*, 2013.

Imersos nessa matriz de polissacarídeos, os microrganismos podem se evadir do sistema imunológico e se tornarem mais resistentes as drogas utilizadas para tratamento e isso ocorre por diversos motivos, como a baixa permeabilidade de compostos através da matriz, o metabolismo lento desses microrganismos quando estão na forma sésil e a troca de genes de resistência (URUEN *et al.*, 2020). Além disso, as bactérias que produzem biofilmes são as principais responsáveis por infecções persistentes, levando a cronicidade das infecções. Quando em biofilmes, se desenvolvem de forma mais lenta, muitas vezes promovendo longos processos inflamatórios que podem causar dano tecidual e necrose (NESSE, OSLAND, VESTBY, 2023; VESTBY *et al.*, 2020).

Ainda existem muitas dúvidas acerca do diagnóstico de infecções associadas a biofilmes, principalmente quando os biofilmes são formados em dispositivos médicos. Os microrganismos mais associados a infecções associadas a dispositivos médicos são *E. coli*, *K. pneumoniae*, *A. baumannii*, *P. aeruginosa*, o gênero *Staphylococcus* e os fungos do gênero *Candida* (NIVEDITHA *et al.*, 2012; POLONI; ROTTA, 2020; SIDRIM *et al.*, 2019). Esse tipo de infecção tem um alto custo para o hospital, pois muitas vezes é necessária a retirada do dispositivo médico, além do tratamento com antimicrobianos por longos períodos (WI, PATEL, 2018).

2.5.1 Biofilmes associados a infecções de cateteres vesicais

Cateteres vesicais de demora são dispositivos médicos amplamente utilizados em ambientes hospitalares e são os principais fatores para infecções no trato urinário, pois quanto mais tempo de utilização desses dispositivos, maior a chance de adquirir uma infecção (NIVEDITHA *et al.*, 2012). Estudos demonstram que a *E. coli* é o principal microrganismo envolvido nesse tipo de infecção, podendo chegar a 80% dos casos, porém, outros microrganismos também podem estar presentes em ITUAC's, como a *Klebsiella* spp. e *P. aeruginosa* (NAVARRO *et al.*, 2022; NIVEDITHA *et al.*, 2012).

A patogênese desse tipo de infecção se inicia no momento de introdução do dispositivo, podendo carrear esses patógenos das regiões mais externas do trato urinário para as regiões mais internas ou durante a manipulação do dispositivo para drenagem do sistema (NEWMAN, WYMAN, WELCH, 2016). Apesar dos cateteres serem produzidos para que não haja aderência microbiana ou que, pelo menos, reduza esse processo, os microrganismos conseguem aderir a essas superfícies e acabam encontrando diversas vantagens para sua sobrevivência, como a resistência a força de extrusão da urina (NAVARRO *et al.*, 2022; TRAUTNER, DAROUICHE, 2004).

Diversas pesquisas já foram realizadas para aperfeiçoamento desses dispositivos, seja pela modificação dos materiais que eles são feitos, seja pelo revestimento com compostos antissépticos ou antimicrobianos (FISHER *et al.*, 2015; TRAN, HAMOOD, REID, 2014). Essas pesquisas buscam utilizar compostos que, além de terem ação antimicrobiana, também possam atuar na modulação do *quorum sensing*, como os inibidores de bomba de efluxo (SAINI; CHHIBBER, HARJAI, 2016; SIDRIM *et al.*, 2019).

2.6 Tratamento para ITUs

Muitas das ITUs são autolimitadas, não precisando da administração de antimicrobianos, contudo, o tratamento com antimicrobianos vai variar de acordo com a gravidade da infecção. A escolha do antimicrobiano deve ser guiada por resultados de cultura para avaliar o mais eficaz entre os disponíveis para administração, assim como fatores do hospedeiro, como alergias. Se o paciente faz uso de dispositivo médico, ele deve ser removido ou trocado por um novo, caso necessário o seguimento do uso, antes que a antibioticoterapia se inicie. A antibioticoterapia empírica leva em consideração resultados anteriores do paciente, a epidemiologia local e os prováveis microrganismos

causadores, porém, com o resultado do antibiograma em mãos, a equipe médica automaticamente ajusta para o microrganismo isolado, levando em consideração o perfil de resistência apresentado (BONKAT *et al.*, 2017).

Se a suspeita ou confirmação de bacteremia for relacionada ao dispositivo médico, o tratamento deve ser realizado por via intravenosa. Outro fator levado em consideração é a capacidade dos antimicrobianos de se concentrar em grandes quantidades na urina, como a nitrofurantoína e fosfomicina. Contudo, para casos de pielonefrite, o fármaco utilizado, além de ter a capacidade de atuar como bactericida para o uropatógeno em questão, ele também deve acumular, em altas concentrações no tecido renal. Sendo assim, as drogas mais utilizadas nesses casos são fluoroquinolonas, como a ciprofloxacina (JOHNSON; RUSSO, 2018).

Para ITUs causadas por fungos, apesar da necessidade de terapia antifúngica ser discutida de forma controversa na literatura, o fluconazol é o principal antifúngico utilizado no tratamento. A terapia com o fármaco oferece bons resultados e ele se concentra na urina, sendo uma ótima alternativa para o tratamento de ITU's por *Candida spp.* (PETER *et al.*, 2016). Além dele, existem outras opções, principalmente porque algumas espécies de *Candida spp.* são intrinsecamente resistentes ao fluconazol e para esses casos, utiliza-se flucitosina, equinocandinas e até anfotericina B (ALFOUZAN; DHAR, 2017).

2.7 Inibidores de bomba de efluxo como agentes inibidores da formação de biofilmes

As bombas de efluxo são proteínas transmembranares extremamente importantes fisiologicamente para os microrganismos, sendo responsáveis pelo efluxo de diversos metabolitos (GHOLAMI *et al.*, 2015). Existem variados tipos de bombas de efluxo e elas possuem variadas funções, dentre elas, excretar moléculas *Ai*'s, responsáveis pelo *quorum sensing* na formação e maturação de biofilmes, excreção de compostos químicos nocivos aos microrganismos, como antimicrobianos e toxinas, além de terem um papel fundamental na fisiologia bacteriana, ajudando no transporte de nutrientes e metabólitos (NIKAIDO, TAKATSUKA, 2009).

A multirresistência aos antimicrobianos pode ocorrer por diversos fatores, como resistências intrínsecas, mutações, troca de plasmídeos, transposons ou integrons, na qual cada um codifica a resistência a um agente específico (LI, PLÉSIAT, NIKAIDO, 2015). Inicialmente acreditava-se que a codificação dessas proteínas transmembranares

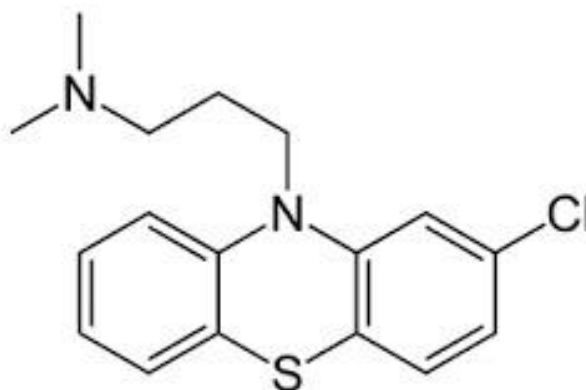
era feita somente por genes plasmidiais, porém hoje, sabe-se que esses genes também podem estar localizados no cromossomo (LI, NIKAIDO, 2004). Existem bombas de efluxo que possuem a capacidade de se ligar a vários substratos não relacionados estruturalmente e realizar a extrusão destes para o meio externo e elas podem estar ligadas a genes cromossômicos ou plasmidiais (ZGURSKAYA *et al.*, 2021).

Os inibidores de bombas de efluxo ou moduladores de *quorum sensing* tem sido um importante objeto de estudo para o desenvolvimento de estratégias para combate a essas infecções, principalmente quando associada a formação de biofilmes (WANG, VENTER, MA, 2016). A atividade antimicrobiana é potencializada quando a utilização destes compostos capazes de inibir a atividade dessas proteínas transmembranares são combinados com antimicrobianos clássicos (WANG, VENTER, MA, 2016). Dessa forma, a exploração de novos compostos capazes de interferir nesses mecanismos, podem ser uma estratégia eficaz para combate a infecções persistentes ou por bactérias multirresistentes, podendo não exercer uma pressão seletiva, já que não atua nos sítios de ação desses fármacos clássicos (LU *et al.*, 2023).

2.7.1 Clorpromazina

A clorpromazina (C₁₇H₁₉ClN₂S) (**Figura 4**) foi desenvolvida em 1950 para ser um anti-histamínico, porém, foi observado efeitos calmantes e mais tarde ela se tornou a primeira droga antipsicótica eficaz, considerada a “penicilina química” (DUDLEY, LIU, HAAN, 2017). A clorpromazina faz parte do grupo das fenotiazinas e é um antipsicótico utilizado no tratamento da esquizofrenia, graças a ela, muitos pacientes puderam deixar asilos a partir da década de 50 e hoje ela é um dos cinco medicamentos essenciais para esses transtornos, listados pela Organização Mundial da Saúde (OMS) (DUDLEY, LIU, HAAN, 2017). Além disso, seu extenso uso clínico demonstrou outro achado interessante para a comunidade médica, ela possuía um efeito antimicrobiano contra cepas de *Mycobacterium tuberculosis*, mas que não foi explorado pelo seus efeitos colaterais de uso crônico e pelo lançamento de fármacos antituberculose na mesma época, como a isoniazida (AMARAL *et al.*, 2001). A clorpromazina também é classificada como um inibidor de bomba de efluxo e seu poder antimicrobiano já foi relatado em diversas pesquisas, bem como sua ação potencializadora quando combinada com antimicrobianos (COELHO *et al.*, 2015; COUTINHO *et al.*, 2010; GRIMSEY *et al.*, 2020).

Figura 4. Estrutura molecular da clorpromazina.



Fonte: DUDLEY, LIU, HAAN, 2017.

A clorpromazina já é estudada há bastante tempo devido sua atividade antimicrobiana (DASTIDAR *et al.*, 2013; GRIMSEY, PIDDOCK, 2019). Em um estudo realizado em 2008 com cepas de *Salmonella enterica*, foram observadas concentrações mínimas inibitórias (CIM's) variadas e demonstrou um sinergismo com diferentes antimicrobianos, reduzindo mais de duas vezes o CIM desses antimicrobianos (BAILEY, PAULSEN, PIDDOCK, 2008). Outro estudo anteriormente realizado já demonstrava o alto poder antimicrobiano da clorpromazina com cepas de *E. coli* ATCC 25922, demonstrando que uma concentração pequena já era capaz de inibir completamente o crescimento da cepa (AMARAL; LORIAN, 1991).

Sua ação sinérgica com alguns antimicrobianos também foi relatada por Chan, Ong e Chua (2007), quando demonstraram que a clorpromazina, assim como algumas outras fenotiazinas, não apresentaram ação antimicrobiana contra isolados de *B. pseudomallei*, mas potencializaram a ação de antimicrobianos. A ação da clorpromazina sobre bombas de efluxo já foi comprovada em muitos estudos, inibindo a formação de biofilmes, gerando espécies reativas de oxigênio ou aumentando a sensibilidade de algumas espécies de *Candida* sp. à anfotericina B (FIALLOS *et al.*, 2022; GALGÓCZY *et al.*, 2011). A ação também se estende para os mais variados tipos de organismos, existem pesquisas que comprovam sua atuação no potencial transmembrana da *Leishmania donovani* e outros que demonstraram a ação antimicrobiana do composto sobre espécies de *Candida* spp. com CIM's relativamente baixos (GALGÓCZY *et al.*, 2011; WOOD, NUGENT, 1985; ZILBERSTEIN, LIVEANU, 1990).

2.8 Impregnação ou revestimento de dispositivos biomédicos com antimicrobianos ou compostos antibiofilme

O desenvolvimento de novos antimicrobianos geralmente leva muito tempo e, mesmo que chegue na fase clínica, pode apresentar falhas e não ser aprovado para uso clínico (ASHBURN; THOR, 2004). Uma estratégia que vem sendo abordada com frequência em pesquisas é o reposicionamento de fármacos, pois salta uma importante etapa, afinal, são compostos ou moléculas já utilizadas clinicamente com outras finalidades, mas que possuem ação antimicrobiana (BARBAROSSA *et al.*, 2022; SIDRIM *et al.*, 2017). Outra estratégia importante e recomendada por pesquisadores internacionais é o revestimento ou a impregnação de dispositivos médicos com compostos com poder antimicrobiano ou antibiofilme para combater infecções associadas a esses dispositivos (FISHER *et al.*, 2015; TENKE *et al.*, 2008).

Diversas pesquisas já foram produzidas utilizando o revestimento de cateteres com antibióticos ou antissépticos, como triclosan, rifampicina e até clorpromazina, e demonstraram resultados promissores no combate a infecções pelos os mais variados tipos de microrganismos (FISHER *et al.*, 2015; GALGÓCZY *et al.*, 2011; PICKARD *et al.*, 201; SIDRIM *et al.*, 2019). O estudo de Fisher *et al.*, (2015) demonstrou que a combinação de alguns compostos impregnados em cateteres de demora inibia a formação de biofilme nesses dispositivos em mais de 90%.

A utilização de antimicrobianos pode forçar uma pressão seletiva nos microrganismos e, com isso, o aumento de microrganismos resistentes. A estratégia de utilizar compostos que possuam efeito antimicrobiano ou antibiofilme, como os inibidores de bomba de efluxo, mas que utilizem outras vias como mecanismo de ação, pode ser uma eficaz estratégia no combate a infecções sem exercer uma pressão seletiva nos microrganismos, além de agir com sinergismo quando combinados com antimicrobianos. Dessa forma, esse estudo propôs a impregnação de cateteres de Foley com o inibidor de bomba de efluxo clorpromazina para inibição da formação de biofilmes por *E coli*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa*, *P. mirabilis* e espécies de *Candida* spp.. Portanto, almeja-se contribuir com conhecimento acerca da utilização de dispositivos médicos impregnados com o inibidor de bomba de efluxo clorpromazina sobre a formação de biofilmes e sobre biofilmes maduros de bactérias e fungos.

3 HIPÓTESES

1. A clorpromazina inibe a formação de biofilmes e desestrutura biofilmes maduros de *P. aeruginosa* associados à infecção do trato urinário.
2. A clorpromazina inibe a formação de biofilmes e desestrutura biofilmes maduros de *Candida* spp. associados à infecção do trato urinário.
3. A impregnação de cateteres urinários de demora com clorpromazina, nas concentrações de 200, 400 e 600 µg/mL, impede a formação de biofilmes por bacilos Gram negativos nesses dispositivos médicos.
4. A impregnação de cateteres urinários de demora com clorpromazina, na concentração de 400 µg/mL, impede a formação de biofilmes por *Candida* spp. nesses dispositivos médicos.
5. A ação de antimicrobianos, quando associados aos cateteres impregnados em diferentes concentrações, é potencializada, destruindo biofilmes maduros.

4. OBJETIVO GERAL/ OBJETIVOS ESPECÍFICOS

4.1 Objetivo Geral

Avaliar o efeito da clorpromazina *in vitro* e impregnada em fragmentos de cateter de Foley sobre a formação de biofilmes e sobre biofilmes maduros de bacilos Gram negativos e *Candida* spp. associados a quadros de infecção do trato urinário.

4.2 Objetivos específicos

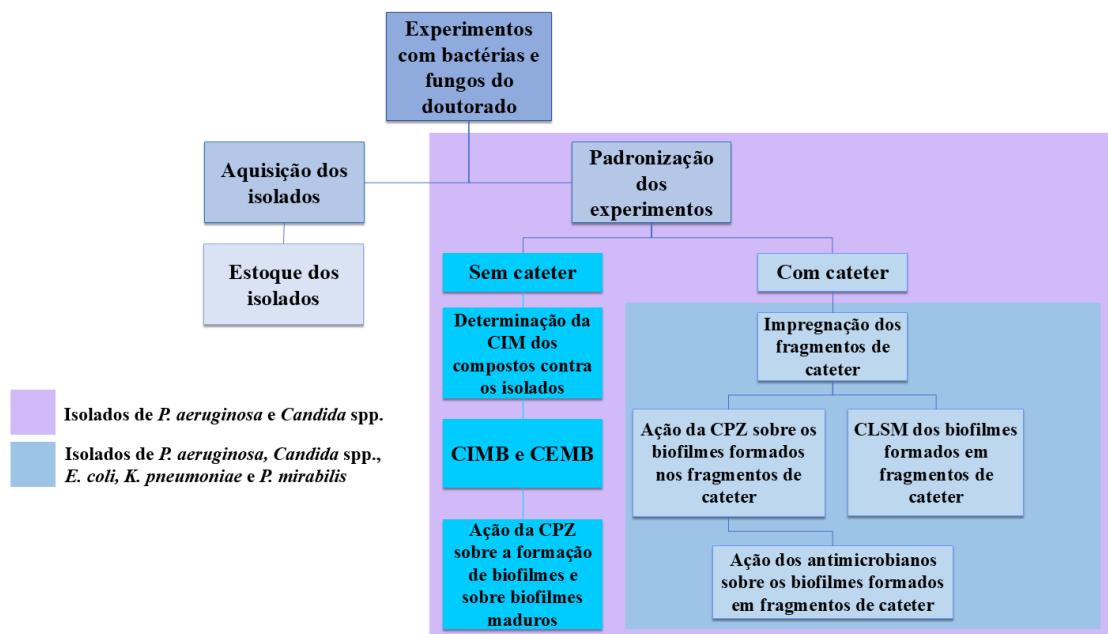
1. Determinar a sensibilidade *in vitro* de *Pseudomonas aeruginosa* associada à infecção do trato urinário, na forma planctônica, à clorpromazina e aos antimicrobianos ciprofloxacina e meropenem;
2. Determinar a sensibilidade *in vitro* de *Candida* spp. associadas à infecção do trato urinário, na forma planctônica, à clorpromazina e aos antifúngicos fluconazol e caspofungina;
3. Avaliar o efeito *in vitro* da clorpromazina sobre a formação de biofilmes e sobre os biofilmes maduros de cepas de *P. aeruginosa* e *Candida* spp.;
4. Avaliar o efeito da impregnação de cateteres urinários com clorpromazina, nas concentrações de 200 e 600 µg/mL, sobre a formação de biofilmes por cepas de *E. coli*, *P. mirabilis* e *K. pneumoniae*;

5. Avaliar o efeito da impregnação de cateteres urinários com clorpromazina, nas concentrações de 200, 400 e 600 $\mu\text{g/mL}$, sobre a formação de biofilmes por cepas de *P. aeruginosa*;
6. Avaliar o efeito da impregnação de cateteres urinários com clorpromazina, na concentração de 400 $\mu\text{g/mL}$, sobre a formação de biofilmes por cepas de *Candida* spp.;
7. Avaliar a ação da ciprofloxacina e do meropenem sobre biofilmes bacterianos maduros formados em cateteres urinários impregnados ou não com clorpromazina, nas concentrações de 200, 400 e 600 $\mu\text{g/mL}$;
8. Avaliar a ação do fluconazol e da caspofungina sobre biofilmes fúngicos maduros formados em cateteres urinários impregnados ou não com clorpromazina, na concentração de 400 $\mu\text{g/mL}$.

5. METODOLOGIA

Um fluxograma foi criado com as etapas dos experimentos, para melhor compreensão da metodologia aplicada a pesquisa (**Figura 5**).

Figura 5. Fluxograma utilizado na metodologia do estudo.



CIM – Concentração Inibitória Mínima; CIMB - Concentração inibitória Mínima em Biofilmes; CEMB - Concentração Eliminatória Mínima em Biofilme; CPZ – Clorpromazina; CLSM - Confocal Laser Scanning Microscopy.

5.1 Local do estudo

A pesquisa foi executada no laboratório de bacteriologia - Grupo Aplicado em Microbiologia Médica (GrAMM) e com colaboração do Centro Especializado em Micologia Médica (CEMM) da Universidade Federal do Ceará.

5.2 Microrganismos do estudo

Foram selecionadas 28 isolados, sendo 13 pertencentes a bacterioteca do laboratório de bacteriologia do Grupo Aplicado em Microbiologia Médica (GrAMM) e 15 pertencentes a micoteca do Centro Especializado em Micologia Médica (CEMM). As bactérias selecionadas foram 6 isolados da espécie *P. aeruginosa*, 2 de *E. coli*, 3 de *K. pneumoniae* e 2 de *P. mirabilis*. Já os fungos selecionados foram 4 *C. albicans*, 5 *C. tropicalis*, 5 *C. parapsilosis* stricto sensu e 1 *C. krusei*. Todos os microrganismos selecionados para a pesquisa haviam sido previamente identificados por VITEK® ou Maldi-Tof® (bioMerieux), com exceção das cepas padrão utilizadas no estudo.

Foram adicionadas na pesquisa uma cepa padrão para cada espécie incluída, todas doadas da Coleção de Microrganismos de Referência em Vigilância Sanitária-CMRVS, FIOCRUZ-INCQS, Rio de Janeiro, RJ com nomenclaturas: *Escherichia coli* INCQS 00033 (ATCC 25922), *Klebsiella pneumoniae* INCQS 00532 (ATCC 600703) e *Proteus mirabilis* INCQS 00265 (ATCC 29906), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC27853), *Candida albicans* (ATCC10231), *Candida tropicalis* (ATCC750), *Candida parapsilosis* (ATCC22019) e *Candida krusei* (ATCC6258).

Todas as cepas e isolados foram avaliados quanto à capacidade de formar biofilmes baseado em dois protocolos utilizados em estudos anteriores (BRILHANTE *et al.* 2016; SIDRIM *et al.* 2019). Para isso, uma placa de microtitulação de 96 poços com fundo chato foi utilizada. Para as bactérias, cada poço foi inoculado com 200 µL de uma suspensão padronizada ($1,7 \times 10^7$ ufc/mL), preparada a partir de um caldo infusão cérebro coração (BHI) enriquecido com 1% de glicose. Para os fungos, foi utilizada uma suspensão preparada com caldo RPMI 1640 e inóculo fúngico até atingir a escala 1 de McFarland, após isso foi inoculado em cada poço 100µL dessa solução com inóculo mais 100µL de RPMI 1640. Após a inoculação nos poços, as placas foram incubadas em estufa bacteriológica a 37 °C, por 48 horas, para formação do biofilme. Cada isolado foi inoculado em triplicata na placa e cada placa teve poços com controles de esterilidade.

Para a quantificação da biomassa dos biofilmes aderidos nas placas, utilizou-se a espectrofotometria para mensurar a densidade óptica a um comprimento de onda de 490 nm (DO₄₉₀) e o corante cristal violeta seguindo o protocolo preconizado no estudo anterior (SIDRIM *et al.* 2019).

Tabela 01 – Isolados selecionados para o estudo.

Cepa	Código	Capacidade de formar biofilme	Origem	Referência
<i>Escherichia coli</i>	ECAT	SIM	ATCC 25922	SIDRIM <i>et al.</i> 2019
<i>Escherichia coli</i>	EAEC*	SIM	Cepa referência	SIDRIM <i>et al.</i> 2019
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	KLAT	SIM	ATCC 600703	SIDRIM <i>et al.</i> 2019
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	KL1S	SIM	Urina	SIDRIM <i>et al.</i> 2019
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	KL2M	SIM	Urina	SIDRIM <i>et al.</i> 2019
<i>Proteus mirabilis</i>	PRAT	SIM	ATCC 29906	SIDRIM <i>et al.</i> 2019
<i>Proteus mirabilis</i>	PRMR2	SIM	Urina	SIDRIM <i>et al.</i> 2019
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	PAATCC	SIM	ATCC27853	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	PAS1	SIM	Urina	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	PAR1	SIM	Urina	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	PAR4	SIM	Urina	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	PAS5	SIM	Urina	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	PAM1	SIM	Urina	
<i>Candida albicans</i>	CAATCC	SIM	ATCC10231	
<i>Candida albicans</i>	CACRN18	SIM	Micoteca	
<i>Candida albicans</i>	CACRN30	SIM	Micoteca	
<i>Candida albicans</i>	CASTN	SIM	Micoteca	
<i>Candida tropicalis</i>	CTATCC	SIM	ATCC750	
<i>Candida tropicalis</i>	CTC01	SIM	Micoteca	
<i>Candida tropicalis</i>	CTC02	SIM	Micoteca	
<i>Candida tropicalis</i>	CTC03	SIM	Micoteca	
<i>Candida tropicalis</i>	CTC04	SIM	Micoteca	
<i>Candida parapsilosis</i>	CPATCC	SIM	ATCC22019	
<i>Candida parapsilosis</i>	CPJETE	SIM	Micoteca	
<i>Candida parapsilosis</i>	CPJT24	SIM	Micoteca	
<i>Candida parapsilosis</i>	CPJ818	SIM	Micoteca	
<i>Candida parapsilosis</i>	CP8TA	SIM	Micoteca	
<i>Candida krusei</i>	CKATCC	SIM	ATCC6258	

* *Escherichia coli* Enteroagregativa.

5.3 Determinação das concentrações inibitórias mínimas (CIM) da clorpromazina e dos antimicrobianos contra isolados de *Pseudomonas aeruginosa* e *Candida* spp.

A sensibilidade dos 21 isolados à clorpromazina (CPZ; 5 mg/mL, HYPOFARMA) e aos antimicrobianos foi avaliada de acordo com recomendado pelo documento M100 – S27 do Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI, 2019) para bactérias e pelo documento M27-A3 (CLSI, 2012) para os fungos. Cepas ATCC e drogas antimicrobianas clássicas, permitiram validar o experimento. A CIM de *E. coli*,

K. pneumoniae e *P. mirabilis* foi avaliada em estudo anterior, não sendo necessário incluí-los nesse ensaio (SIDRIM *et al.*, 2019).

5.3.1 Inóculos

Inicialmente, os isolados bacterianos foram semeados em ágar BHI e os isolados fúngicos em ágar Sabouraud. A seguir, foram incubados em estufa bacteriológica a 37 °C, por 24 horas, para crescimento microbiano. Em seguida, os inóculos bacterianos foram preparados em solução salina estéril e os fúngicos em meio de cultura RPMI 1640, ajustando a turbidez a 0,5 na escala de McFarland, que corresponde a $1,5 \times 10^8$ ufc/mL. Finalizada essa etapa, os inóculos bacterianos foram diluídos em caldo Mueller Hinton (MH), até alcançar a concentração recomendada de 5×10^5 ufc/mL e os fúngicos diluídos em meio de cultura RPMI 1640 para obtenção de inóculo final contendo $0,5$ a $2,5 \times 10^3$ ufc/mL (CLSI, 2012;2019).

5.3.2 Clorpromazina e antimicrobianos

A concentração testada para clorpromazina variou de 2,44 – 1.250 µg/mL. Já para os antimicrobianos, as concentrações utilizadas foram 0,0005 – 16 µg/mL para ciprofloxacina (CIP; Sigma, Brasil), de 0,03 – 16 µg/mL para meropenem (MER; Sigma, Brasil), 0,125 a 64 µg/mL para fluconazol (FLC; Merck KgaA, Darmstadt, Germany) e 0,031 a 16 µg/mL e para caspofungina (CAS; Sigma Chemical Corporation, USA).

5.3.3 Preparo da placa e ensaio

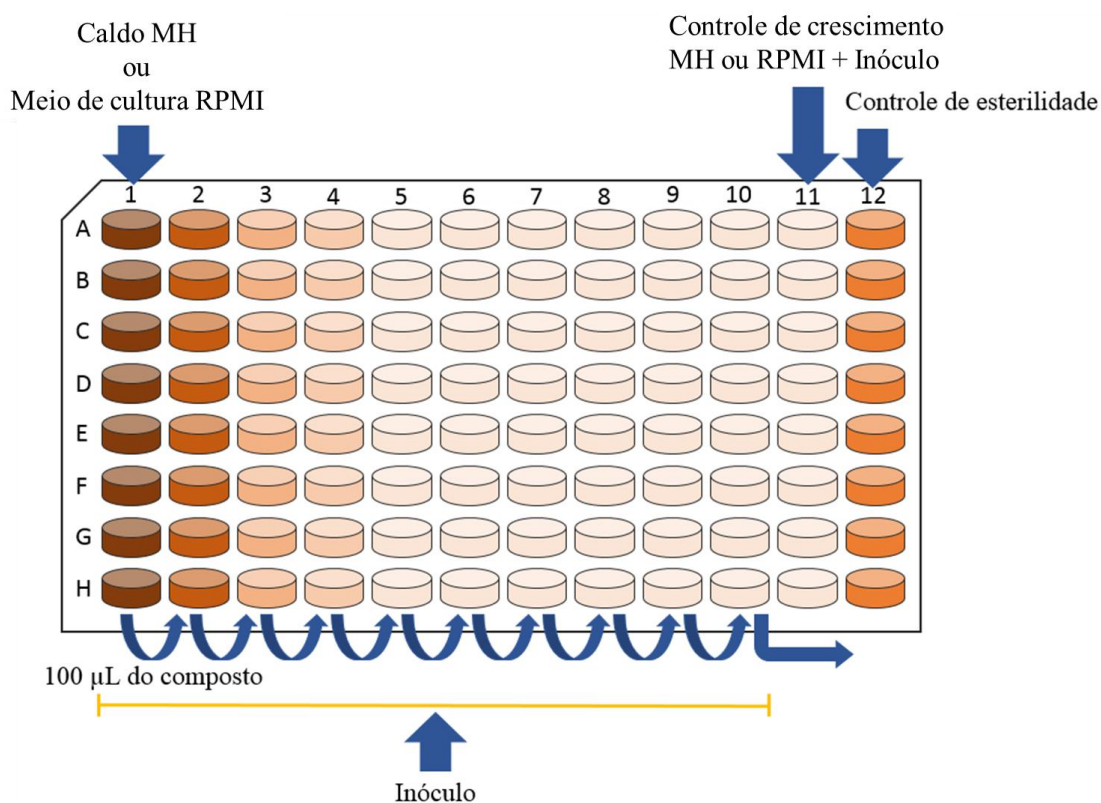
Para o ensaio, foram utilizadas placas de microtitulação de 96 poços de fundo em U, nas quais foram adicionadas 100 µL de caldo MH em todos os poços para o teste de sensibilidade com as bactérias e 100 µL de meio de cultura RPMI 1640 para o teste de sensibilidade com os fungos.

Em seguida, foram adicionados mais 100 µL do composto e/ou antimicrobianos somente nas primeiras colunas das respectivas placas, após isso, foi feita a diluição seriada iniciando na coluna 1, na qual, foi homogeneizado e retirado 100 µL dos poços e adicionados nos poços da coluna 2, onde repetiu-se a homogeneização e retirada também de 100 µL para adição nos poços da coluna 3 e assim sucessivamente, até a coluna 10. Finalizada essa etapa, foram retirados 100 µL da coluna 10 e transferidos para a coluna 12, a qual foi utilizada como controle de esterilidade do experimento. Os

poços da coluna 11 foram utilizados como controle de crescimento do ensaio. Após a diluição dos compostos nas placas, 100µL dos inóculos preparados anteriormente foram adicionados a cada poço, iniciando na coluna 1 até a coluna 11. A **Figura 6** demonstra, de forma ilustrativa, o esquema de preparo da placa. As placas foram incubadas em estufa bacteriológica a 37 °C, por 24 horas. A leitura da placa foi realizada de forma visual, como recomendam os protocolos do CLSI (2012). Todo o ensaio foi realizado em duplicata.

Para a leitura dos testes de sensibilidade, buscou-se encontrar a concentração inibitória mínima (CIM). Para clorpromazina e para os antimicrobianos ciprofloxacina, meropenem e caspofungina, foi definida como CIM a menor concentração capaz de causar 100% de inibição do crescimento (CLSI, 2012; SIDRIM *et al.*, 2019), já para o fluconazol foi definida como CIM a menor concentração capaz de causar 50% de inibição do crescimento, quando comparado com o controle de crescimento (CLSI, 2012).

Figura 6. Desenho esquemático para o teste de sensibilidade baseado no protocolo M27-A3 (CLSI, 2012) e M100, CLSI (2017).



Fonte: Elaborado pelo autor.

5.4 Análise da clorpromazina sobre a formação dos biofilmes por *Pseudomonas aeruginosa* e *Candida* spp.

Foi avaliada a ação da clorpromazina sobre a formação de biofilmes dos isolados do estudo. O ensaio para os isolados de *P. aeruginosa* foi realizado em placas de microtitulação de 96 poços de fundo chato, de acordo com Sidrim *et al.* (2019) e o ensaio com *Candidas* spp. foi realizado de acordo com Bandeira *et al.* (2016), com modificações. As concentrações utilizadas no ensaio foram a CIM para cada isolado a partir do teste de sensibilidade realizado anteriormente mais duas concentrações subinibitórias (CIM/2 e CIM/4).

Para as bactérias, inicialmente, foram semeadas em ágar BHI e incubados à 37 °C, por 24 horas. Após isso, foram preparados inóculos utilizando salina estéril em um tubo para cada isolado. A turbidez foi ajustada de acordo com a escala 0,5 de McFarland. Para essa etapa, as diferenças entre os dois protocolos é que o meio de cultura utilizado para semear os fungos foi o ágar Sabouraud, o caldo usado foi o RPMI 1640 e a escala utilizada para o inóculo foi a de 1 de McFarland.

As diluições do composto para os ensaios foram preparadas e, em seguida, distribuídas nas placas de forma ordenada, onde, para as bactérias, as colunas 1, 2 e 3 receberam 175 µL de caldo BHI enriquecido com 1% de glicose por poço, as colunas 4, 5 e 6 receberam 175 µL de caldo BHI enriquecido com 1% de glicose mais a maior concentração do composto (a CIM do composto para cada isolado), as colunas 7, 8 e 9 receberam 175 µL de caldo BHI enriquecido com 1% de glicose mais a concentração intermediária (50% da CIM do composto para cada isolado) e as colunas 10, 11 e 12 receberam 175 µL de caldo BHI enriquecido com 1% de glicose mais a menor concentração (25% da CIM do composto para cada isolado). Após as placas estarem com as diluições distribuídas, 25 µL de cada inóculo foram adicionados para completar 200 µL de solução por poço. Já para os fungos, o mesmo processo foi realizado, porém, o volume de meio de cultura adicionado aos poços com as diluições do composto foi de 100 µL e o inóculo adicionado posteriormente foi, também, de 100 µL, finalizando com 200 µL de solução por poço. Para que as concentrações do composto ficassem no valor desejado na solução final, foi realizado um cálculo prévio para ajuste das concentrações.

Em todas as placas foram incluídos os controles de esterilidade. As placas foram incubadas a 37 °C, por 48 horas, para formação do biofilme e quantificadas posteriormente com o protocolo que utiliza o cristal violeta como corante de biomassa (SIDRIM *et al.* 2019).

5.5 CIMB e CEMB da clorpromazina dos isolados de *Pseudomonas aeruginosa* e *Candida* spp.

Para determinar a atividade do composto sobre os biofilmes maduros dos 6 isolados de *P. aeruginosa* do estudo e dos 15 isolados de *Candida* spp., o biofilme de cada isolado foi crescido em placas de poliestireno de 96 poços de fundo chato, de acordo com Sidrim *et al.*, 2019, com adaptações. Para os isolados de *P. aeruginosa*, os inóculos foram preparados utilizando a escala de turbidez de 0,5 de McFarland e os biofilmes foram montados em um volume total de 200 μ L, em uma proporção de 1:7, sendo 25 μ L de inóculo e 175 μ L de meio BHI-glicose 1%. Para *Candidas* spp., os inóculos foram preparados utilizando a escala de turbidez de 1 de McFarland e os biofilmes foram montados em um volume total de 200 μ L, em uma proporção de 1:1, sendo 100 μ L de inóculo e 100 μ L de meio RPMI 1640 (BANDEIRA *et al.* 2016).

Ao final das 48 horas de incubação, as placas com as bactérias tiveram seus poços lavados com PBS estéril. Em seguida, concentrações crescentes das drogas foram adicionadas a cada poço juntamente com BHI+glicose 1%, totalizando uma solução de 200 μ L por poço. As concentrações utilizadas da clorpromazina foram entre 0,61-1,250 μ g/mL. Já para os fungos, os poços foram lavados duas vezes com PBS estéril para remoção das células não sésseis, após isso, 200 μ L de meio RPMI 1640 contendo as mesmas diluições seriadas do composto foram adicionadas aos poços contendo biofilme de *Candida* spp.. Todas as placas foram incubadas a 37 °C, por mais 24 h.

Posteriormente, a atividade metabólica dos biofilmes de *P. aeruginosa* foi avaliada por meio do ensaio metabólico com resazurina (SIDRIM *et al.*, 2017) e para as de *Candida* spp. as placas foram lavadas com PBS três vezes, em seguida, foi adicionado uma solução com corante de viabilidade celular brometo 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5 difenil tetrazólio (MTT) (1 mg/ mL) (Sigma, USA) e incubadas por 35°C por 4h, no escuro. Após incubação, o corante foi removido, os poços lavados três vezes com PBS e adicionado DMSO (200 μ L). Após 30 minutos, retirou-se 100 μ L de cada poço e transferiu-se para uma nova placa e foi levado para leitura por espectrofotometria para mensurar a densidade óptica (KUMAR, *et al.*, 2018).

A menor concentração capaz de inibir, de forma parcial, a atividade metabólica do biofilme foi definida como a concentração inibitória mínima do biofilme (CIMB) e a menor concentração capaz de inibir por completo a atividade metabólica do biofilme foi definida como a concentração eliminatória mínima do biofilme (CEMB) (SIDRIM *et*

al., 2017). O controle de crescimento de biofilme sem drogas foi incluído para cada isolado testado. Os testes foram realizados em dois momentos distintos.

5.6 Impregnação dos fragmentos de cateter com clorpromazina

O processo de impregnação dos fragmentos de cateter de látex (nr 12, SOLIDOR) foi realizado de acordo com um protocolo descrito por Sidrim *et al.* (2019), na qual utiliza fragmentos de cateter, com aproximadamente 1 cm de comprimento. Esses fragmentos ficam imersos em clorofórmio PA por 1 hora, para dilatação do material, em seguida foram retirados e deixados por mais 30 minutos em solução contendo as concentrações 200, 400 ou 600 $\mu\text{g/mL}$ de CPZ. Todo o processo foi realizado de forma asséptica e, para garantir a esterilidade do processo, alguns fragmentos foram colocados em tubos contendo caldo BHI e incubados a 37° C, por 24 horas e nenhuma turvação foi observada, comprovando a esterilidade do material. Fragmentos submetidos à imersão em clorofórmio, mas não à impregnação com CPZ foram utilizados como controle de crescimento microbiano (**Figura 7**).

Figura 7. Desenho esquemático para impregnação dos fragmentos de cateter com clorpromazina.



Fonte: Adaptado de Fisher *et al.*, 2015.

Seguindo o protocolo utilizado de Sidrim *et al.*, (2019), onde utilizou-se 10 vezes a moda da CIM da CPZ para os isolados incluídos no estudo (concentração de 400 $\mu\text{g/mL}$), impregnada em fragmentos de cateter de Foley, para avaliar a ação do composto sobre a formação de biofilmes de *E. coli*, *K. pneumoniae* e *P. mirabilis* nos fragmentos impregnados, mais duas concentrações foram incluídas no processo de impregnação, sendo elas 200 $\mu\text{g/mL}$ e 600 $\mu\text{g/mL}$ para os isolados de *E. coli*, *K. pneumoniae* e *P. mirabilis*. Já para os isolados de *P. aeruginosa* foram utilizadas as concentrações de 200, 400 e 600 $\mu\text{g/mL}$ na impregnação dos fragmentos de cateter de Foley e para os isolados de *Candida spp.* foi utilizada somente a concentração de 400

µg/mL, pois foi observado no decorrer dos ensaios que a concentração de 400 µg/mL foi a que demonstrou melhores resultados nos ensaios.

A impregnação dos fragmentos de cateteres de Foley foi testada e comprovada em outro estudo através da microscopia eletrônica de varredura (MEV) associada ao sistema de dispersão de energia (EDS), na qual, foi constatada a presença do composto sobre a superfície dos fragmentos impregnados e a ausência nos fragmentos não impregnados. Todo o processo de impregnação foi depositado para aquisição da patente (SIDRIM *et al.* 2019).

5.7 Ação da clorpromazina, impregnados em fragmentos de cateter, sobre a formação de biofilmes dos isolados do estudo

Após impregnação dos fragmentos de cateteres de Foley com a clorpromazina, foi realizado um ensaio *in vitro* para avaliar a ação do composto sobre a formação de biofilmes por *E. coli* (ECAT e EAEC), *K. pneumoniae* (KLAT, KL2M e KL1S) e *P. mirabilis* (PRAT e PRMR1), *P. aeruginosa* (PAATCC, PAM1), *C. albicans* (CAATCC, CACRN18) *C. tropicalis* (CTATCC, CTC01) *C. parapsilosis* (CPATCC, CPJETE) *C. krusei* (CKATCC) sobre os fragmentos impregnados. Foram escolhidas cepas ATCC e isolados clínicos sensíveis, resistentes ou multirresistentes de cada espécie para o ensaio.

5.7.1 Bactérias

Todos os experimentos mencionados foram realizados para os isolados de *E. coli*, *K. pneumoniae* e *P. mirabilis* em um estudo anterior (SIDRIM *et al.* 2019), porém só foi avaliada a ação da CPZ impregnada em fragmentos de cateter na concentração de 400 µg/mL. Com isso, nesse estudo foram testadas as outras duas concentrações, 200 e 600 µg/mL, para *E. coli*, *K. pneumoniae* e *P. mirabilis* e todas as concentrações para a *P. aeruginosa*. Dessa forma, posteriormente à impregnação dos fragmentos com o composto em diferentes concentrações, foi realizado o teste *in vitro* para avaliar a ação da CPZ sobre a formação de biofilmes por 2 isolados de *P. aeruginosa* (PATCC e PAM1), 2 isolados de *E. coli* (ECAT e EAEC), 3 isolados de *K. pneumoniae* (KLAT, KL2M e KL1S) e 2 isolado de *P. mirabilis* (PRAT e PRMR1) nos fragmentos impregnados.

Os biofilmes foram produzidos conforme já descrito anteriormente, porém, em uma placa de poliestireno de 24 poços, com um ajuste volumétrico em um volume total

de 1000 μL por poço, contendo 875 μL de caldo BHI-glicose a 1% e 125 μL de inóculo bacteriano. Após a adição do meio de cultura na placa, cateteres impregnados e não impregnados de CPZ foram adicionados aos poços, seguido da adição do inóculo bacteriano. Em seguida, as placas foram incubadas a 37 °C, por 48 h.

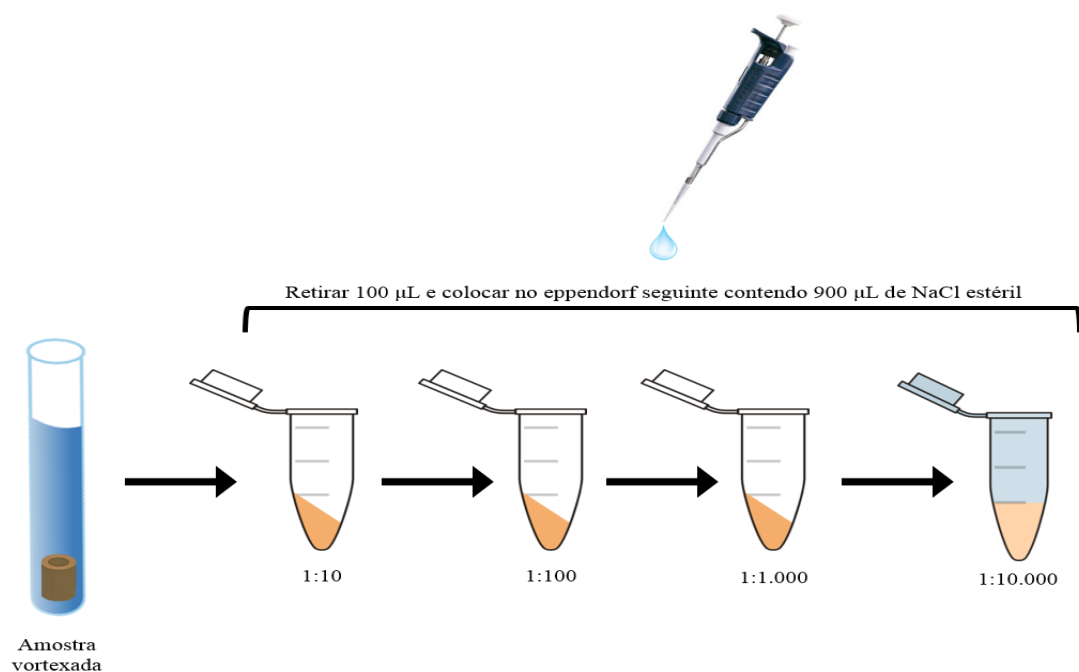
5.7.2 *Leveduras*

A concentração utilizada no ensaio para as *Candida* spp. foi de 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ devido a resultados prévios observados nos ensaios com isolados bacterianos. Com isso, após impregnação dos fragmentos com o composto, o mesmo teste *in vitro* foi realizado para avaliar a ação da CPZ sobre a formação de biofilmes por 2 isolados de *C. albicans* (CAATCC, CACRN18) 2 de *C. tropicalis* (CTATCC, CTC01) 2 de *C. parapsilosis* (CPATCC, CPJETE) e 1 de *C. krusei* (CKATCC) nos fragmentos impregnados. O mesmo protocolo e ajuste volumétrico foi aplicado para os fungos, a diferença entre os protocolos foi que o inóculo utilizado foi padronizado para a escala 1 de McFarland.

5.7.3 *Quantificação e leitura do ensaio*

Após finalização do período de incubação, o meio de cultura foi retirado dos poços, as placas foram lavadas duas vezes com 1 mL de solução salina estéril para a retirada das células microbianas não aderidas ao biofilme. Os fragmentos foram retirados dos poços e colocados em tubos Falcon, contendo 2 mL de solução salina estéril, os quais foram agitados em vórtex por 1,5 minuto para liberação das células microbianas sésseis. Em seguida, a suspensão microbiana foi diluída 1:1.000 e 1:10.000 para os isolados bacterianos e de 1:100 e 1:1.000 para os isolados fúngicos (**Figura 8**). Após isso, 10 μL de cada suspensão foi semeado, com alça de Drigalski, em ágar BHI para os isolados de *E. coli*, *K. pneumoniae* e *P. aeruginosa*, em ágar CLED para *P. mirabilis* e ágar Sabouraud para *Candida* spp., em duplicata (SIDRIM *et al.* 2019). Os ensaios foram realizados em duplicata em dois momentos distintos. Cateteres não impregnados foram usados como controle de crescimento do biofilme.

Figura 8. Desenho esquemático da diluição das amostras submetidas a agitação para desprendimento do biofilme: Primeiro homogeniza-se a amostra, então, retira-se 100 μL do tubo de hemólise e os transfere para o primeiro microtubo, contendo 900 μL de salina estéril. Posteriormente, homogeniza-se a suspensão bacteriana e transferem-se 100 μL do primeiro microtubo para o segundo e, assim, esse procedimento é realizado até o quarto microtubo. As diluições obtidas nesse processo são de 1:10, 1:100, 1:1.000 e 1:10.000 da suspensão inicial. Os isolados bacterianos foram semeados a partir da diluição de 1:1.000 e 1:10.000 e os isolados fúngicos a partir da diluição de 1:100 e 1:1.000



Fonte: Elaborado pelo autor.

5.8 Avaliação da ação de antimicrobianos sobre biofilmes maduros dos isolados do estudo formados em fragmentos cateteres impregnados ou não com clorpromazina

O mesmo protocolo descrito anteriormente foi realizado, porém os antimicrobianos meropenem, ciprofloxacina, fluconazol ou caspofungina, na concentração referente a CIM contra cada isolado, foram adicionados aos poços contendo biofilmes maduros formados sobre fragmentos de cateteres, ou seja, após 48h de incubação prévia. De forma resumida, após incubação, os poços foram lavados com PBS estéril e foram adicionados meio de cultura mais a CIM de cada antimicrobiano.

Essa etapa foi montada em duplicata, sendo os primeiros dois poços reservados para o controle do experimento, tendo apenas meio de cultura mais o biofilme maduro

formado sobre o fragmento de cateter não impregnado, dois poços com o meio de cultura mais o biofilme maduro formado sobre o fragmento impregnado com clorpromazina, dois poços com o meio de cultura, acrescido da CIM dos antimicrobianos para cada cepa microbiana mais o biofilme maduro formado sobre o fragmento impregnado com clorpromazina e, por fim, dois poços com meio de cultura acrescido da CIM dos antimicrobianos para cada cepa mais o biofilme maduro formado sobre o fragmento de cateter não impregnado. Em seguida as placas foram incubadas à 37 °C, por mais 24 horas. Passado esse período, foram quantificadas utilizando a mesma metodologia descrita anteriormente.

5.9 Avaliação por microscopia confocal dos biofilmes, formados em fragmentos de cateteres impregnados com clorpromazina, de *E. coli*, *K. pneumoniae*, *P. mirabilis*, *P. aeruginosa* e *Candida* spp.

Para a avaliação por microscopia confocal, os biofilmes foram crescidos de acordo com o protocolo já mencionado anteriormente (**Seção 5.7**), porém, após 48h, os cateteres foram lavados e colocados em placas de Petri de fundo de vidro. Para análise com 200 µL de uma solução preparada com 1 mL de salina mais 1,5 µL de cada composto do kit LIVE/DEAD® (Thermo Fisher Scientific), sob proteção da luz, segundo a metodologia descrita por CORDEIRO *et al.* (2019). Foram lidos 10 campos por amostra e as amostras foram visualizadas em microscópio Confocal Nikon C2, a 488 nm para detecção do fluorocromo Syto9, para células vivas, e a 561 nm e para o fluorocromo iodeto de propídio, que evidencia células mortas e/ou danificadas. Imagens tridimensionais foram coletadas dos biofilmes, a fim de se obterem resultados representativos das amostras (COLLINS, 2007; SIDRIM *et al.*, 2019).

5.10 Análise estatística

Os dados foram, inicialmente, avaliados quanto à simetria. Em seguida, para avaliar o efeito da clorpromazina sobre a formação de biofilmes e sobre o biofilme maduro das cepas estudadas, utilizou-se o teste de 2-way-ANOVA para análises com pós teste de Bonferroni. Para avaliar o efeito global da impregnação dos cateteres com clorpromazina e dos antimicrobianos sobre a contagem de ufc bacterianas, foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis seguido de pós teste Dunns comparando todos os pares e colunas. Ademais, a análise 2-way-ANOVA foi realizada para avaliar o efeito dos tratamentos (cateter impregnado, antimicrobiano e cateter impregnado +

antimicrobiano) sobre cada cepa, individualmente. Para todos os testes aplicados, valores de $P < 0,05$ permitiram tirar conclusões significativas.

6. RESULTADOS

6.1 Determinação das concentrações inibitórias mínimas (CIM) da clorpromazina (CPZ) e dos antimicrobianos contra isolados de *Pseudomonas aeruginosa* e *Candida* spp.

A CIM da clorpromazina para os isolados de *E. coli*, *K. pneumoniae* e *P. mirabilis* incluídos no estudo foram determinados em um estudo anterior (SIDRIM, *et al.*, 2019). A clorpromazina apresentou CIMs que variaram de 312,5 – 625 µg/mL contra *P. aeruginosa*. 5 dos 6 isolados de *P. aeruginosa* apresentaram a mesma CIM para clorpromazina, 312,5 µg/mL, com exceção da PAR5, que apresentou uma CIM de 625 µg/mL, como demonstra a **Tabela 02**. Já a clorpromazina apresentou CIMs para os isolados de *Candida* spp. com uma maior variância, 9,76 – 39,06 µg/mL, além de, em comparação com as *P. aeruginosa*, serem consideravelmente menores **Tabela 03**.

Os antimicrobianos incluídos no estudo também demonstraram uma grande variabilidade de CIMs. Para as bactérias, a ciprofloxacina apresentou CIMs que variaram de 0,5 - >32 µg/mL e o meropenem CIMs que variaram de 0,125 – 16 µg/mL, já para os fungos, o Fluconazol apresentou CIMs que variaram de 0,25 – 16 µg/mL e a caspofungina CIMs que variaram de <0,03 – 1 µg/mL. Tal diversidade nos CIMs se deve ao fato da inclusão de microrganismos com diferentes perfis de resistência no estudo.

Tabela 02 – Determinação da concentração mínima inibitória (CIM) de *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* e *Proteus mirabilis* associados a infecções do trato urinário a clorpromazina, ciprofloxacina e meropenem.

Bactéria	Origem	Código	MIC (µg/mL)		
			CPZ	CIP	MER
<i>P. aeruginosa</i>	ATCC 29213	PATCC	312,5	0,5	0,25
<i>P. aeruginosa</i>	Urina	PAS1	312,5	32	0,125
<i>P. aeruginosa</i>	Urina	PAR1	312,5	16	0,5
<i>P. aeruginosa</i>	Urina	PAR4	312,5	>32	0,25
<i>P. aeruginosa</i>	Urina	PAR5	625	1	16
<i>P. aeruginosa</i>	Urina	PAM1	312,5	>32	4
<i>E. coli</i>	ATCC 25922	ECAT	39.06	0.008	0.0625
<i>E. coli</i>	Cepa padrão	EAEC	39.06	0.0625	0.125
<i>K. pneumoniae</i>	ATCC 600703	KLAT	156.25	0.25	0.125
<i>K. pneumoniae</i>	Urina	KL1S	78.12	0,125	0.125
<i>K. pneumoniae</i>	Urina	KL2M	39.06	0.0312	0.25
<i>P. mirabilis</i>	ATCC 29906	PRAT	625	0.0312	0.5
<i>P. mirabilis</i>	Urina	PRMR2	625	16	1

* *Escherichia coli* Enteroagregativa. Clorpromazina (CPZ), Ciprofloxacina (CIP) e Meropenem (MER).

Tabela 03 – Determinação da concentração mínima inibitória (CIM) de *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Candida parapsilosis* e *Candida krusei* a clorpromazina, fluconazol e caspofungina.

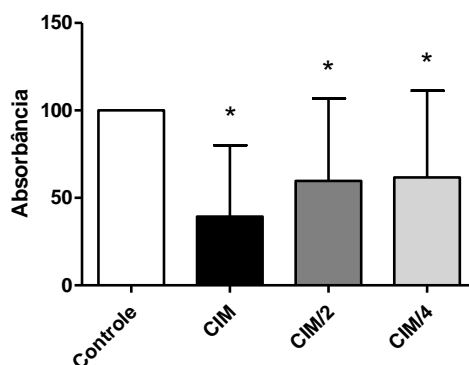
Fungos	Origem	Código	MIC (µg/mL)		
			CPZ	FLC	CAS
<i>C. albicans</i>	ATCC10231	CAATCC	19,53	0,25	0,62
<i>C. albicans</i>	Micoteca	CACRN18	19,53	0,5	<0,03
<i>C. albicans</i>	Micoteca	CACRN30	39,06	0,5	<0,03
<i>C. albicans</i>	Micoteca	CASTN	39,06	0,25	<0,03
<i>C. tropicalis</i>	ATCC750	CTATCC	39,06	0,25	<0,03
<i>C. tropicalis</i>	Micoteca	CTC01	39,06	0,5	<0,03
<i>C. tropicalis</i>	Micoteca	CTC02	19,53	1	<0,03
<i>C. tropicalis</i>	Micoteca	CTC03	19,53	1	0,62
<i>C. tropicalis</i>	Micoteca	CTC04	39,06	2	<0,03
<i>C. parapsilosis</i>	ATCC22019	CPATCC	19,53	1	0,5
<i>C. parapsilosis</i>	Micoteca	CPJETE	19,53	0,25	1
<i>C. parapsilosis</i>	Micoteca	CPJT24	19,53	0,25	1
<i>C. parapsilosis</i>	Micoteca	CPJP18	39,06	1	<0,03
<i>C. parapsilosis</i>	Micoteca	CP8TA	9,76	16	0,5
<i>C. krusei</i> *	ATCC6258	CKATCC	9,76	8	1

*Cepa de referência *C. krusei* ATCC6258 é intrinsecamente resistente ao Fluconazol. Clorpromazina (CPZ), Caspofungina (CAS) e Fluconazol (FLC).

6.2 Análise da clorpromazina sobre a formação dos biofilmes por *Pseudomonas aeruginosa* e *Candida* spp.

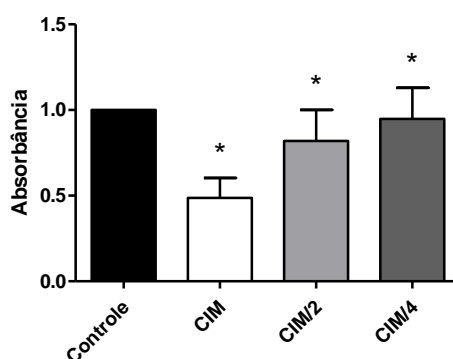
A concentração utilizada no ensaio *in vitro* para todos os isolados foi a CIM encontrada no teste de sensibilidade à CPZ (**Tabela 02 e 03**), mais duas concentrações subinibitórias (CIM/2 e CIM/4). A clorpromazina foi capaz de reduzir significativamente, em todas as concentrações utilizadas, a biomassa dos biofilmes de *P. aeruginosa*. Na CIM, na maior concentração utilizada, houve uma redução de 60,6% da biomassa dos biofilmes em formação quando comparadas ao controle de crescimento, já na CIM/2 e CIM/4 houve uma redução de 40,3% e 38,3% na biomassa dos biofilmes em formação, respectivamente (**Gráfico 01**).

Gráfico 01 – Ação da clorpromazina (CPZ) sobre a formação de biofilmes por *Pseudomonas aeruginosa* (n=6). Dados expressos como média e desvio padrão da absorbância da biomassa, mensurada pela coloração com cristal violeta. *Indica diferença estatística.



Resultados semelhantes foram observados com os isolados de *Candida* spp., onde a clorpromazina foi capaz de reduzir significativamente ($P < 0,05$), em todas as concentrações testadas, a biomassa dos biofilmes fúngicos. A CIM da clorpromazina para cada isolado reduziu cerca de 66% a biomassa dos biofilmes em formação, quando comparadas ao controle de crescimento e a CIM/2 e CIM/4 reduziram 41,9% e 33,1%, respectivamente (**Gráfico 02**). É possível observar que o composto testado teve uma maior ação na inibição da formação dos biofilmes fúngicos, quando comparados com os biofilmes bacterianos.

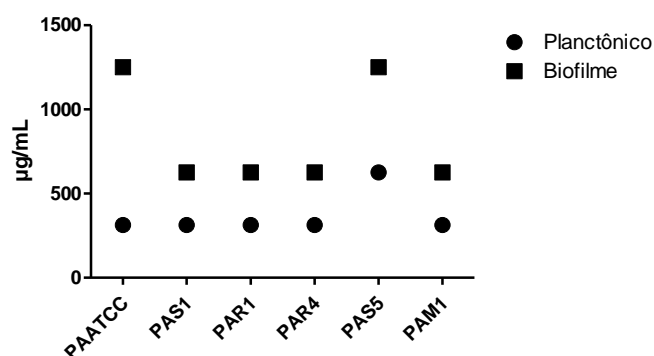
Gráfico 02 – Ação da clorpromazina (CPZ) sobre a formação de biofilmes por *Candida albicans* (n=4), *Candida tropicalis* (n=5), *Candida parapsilosis* (n=5) e *Candida krusei* (n=1). Dados expressos como média e desvio padrão da absorbância da biomassa, mensurada pela coloração com cristal violeta.



6.3 CIMB e CEMB da clorpromazina dos isolados de *Pseudomonas aeruginosa* e *Candida spp.*

Após ensaio de atividade metabólica com os isolados do estudo, observamos que não houve CIMB para CPZ em nenhum dos isolados incluídos no estudo. De maneira geral a clorpromazina apresentou CEMBs que variaram de 156,25 – 1.250 µg/mL contra biofilmes de *P. aeruginosa* e *Candida spp.*. As CEMBs foram, pelo menos, duas vezes maiores que as CIMs para os isolados de *P. aeruginosa* testados, com exceção da PATCC, que apresentou uma CEMB de quatro vezes o valor do CIM (**Gráfico 03**).

Gráfico 03 – Concentrações inibitórias mínimas (CIMs) e concentrações eliminatórias mínimas sobre o biofilme (CEMBs) da clorpromazina contra isolados de *Pseudomonas aeruginosa* (n=6).



Para os isolados de *Candida spp.*, as Concentrações Inibitórias Mínimas Sésil (SMIC) encontradas foram a partir da concentração de 39,06 µg/mL, determinada por uma redução da atividade metabólica maior que 90% dos biofilmes, porém, a SMIC para a maioria dos isolados de *Candida spp.* incluídas no estudo foi de 78,13 µg/mL (**Gráfico 05**). A inibição máxima da atividade metabólica ocorreu a partir da concentração 156,25 µg/mL, como podemos observar abaixo (**Gráfico 04**).

Gráfico 04 – Atividade metabólica dos biofilmes de *Candida* spp. (n=15) expostos a concentrações crescentes de clorpromazina (CPZ).

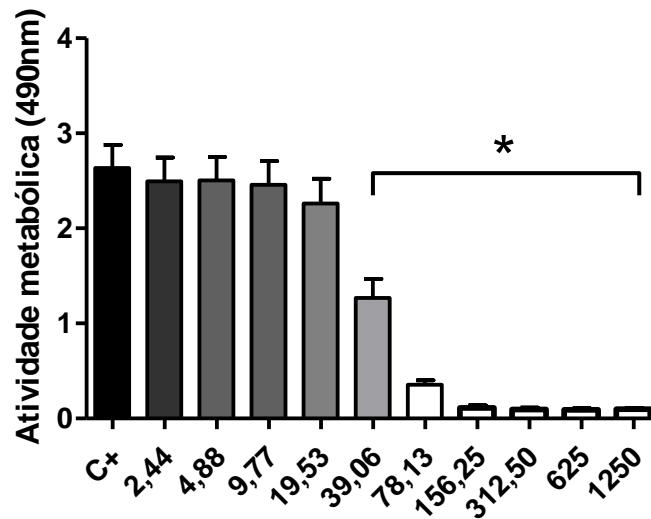
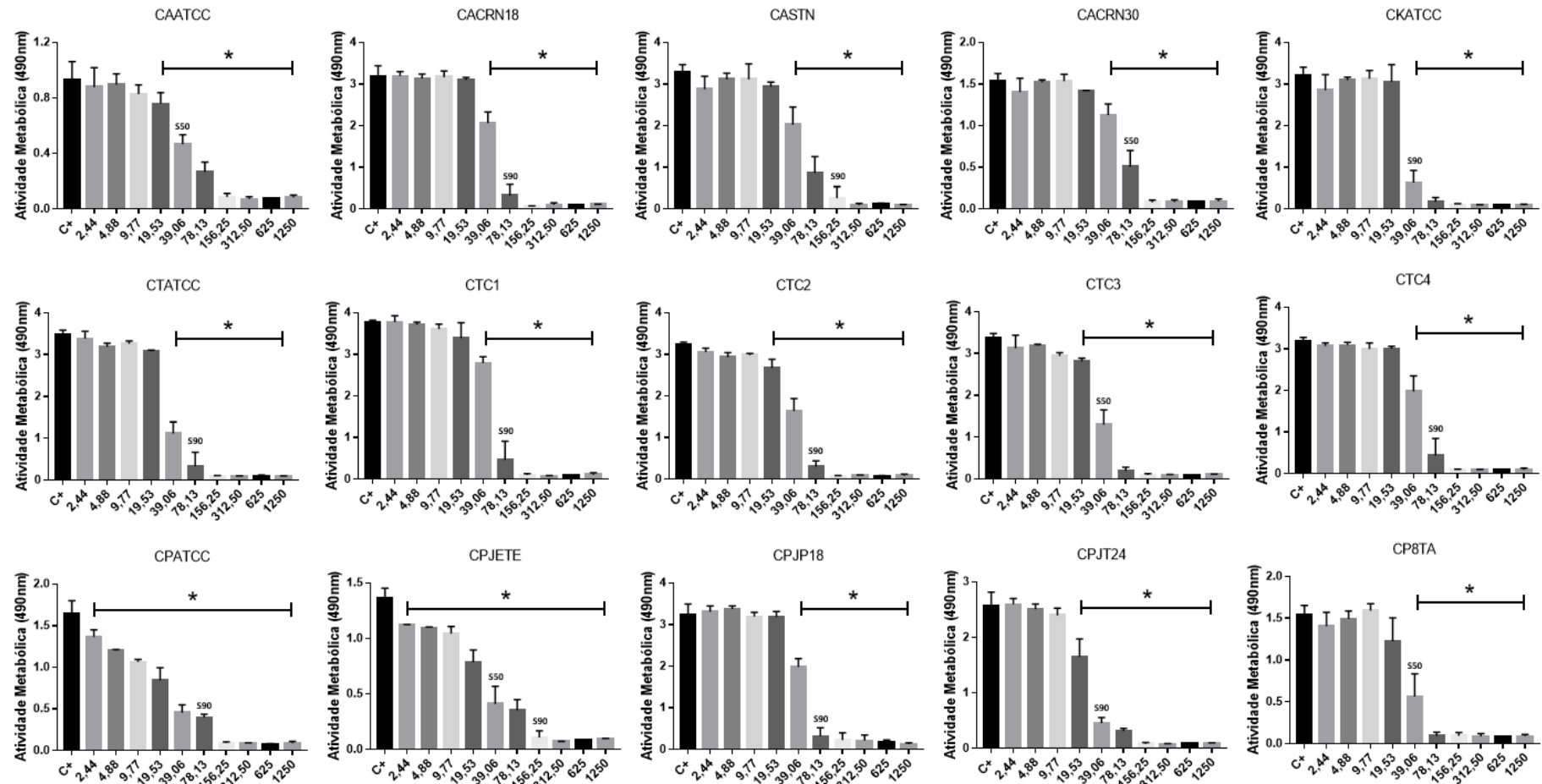


Gráfico 05 – Atividade metabólica dos biofilmes de cada isolado de *Candida* spp. (n=15) expostos a concentrações crescentes de clorpromazina (CPZ). S50 indica redução na atividade metabólica em 50% ou mais dos biofilmes e S90 indica redução na atividade metabólica em 90% ou mais dos biofilmes.

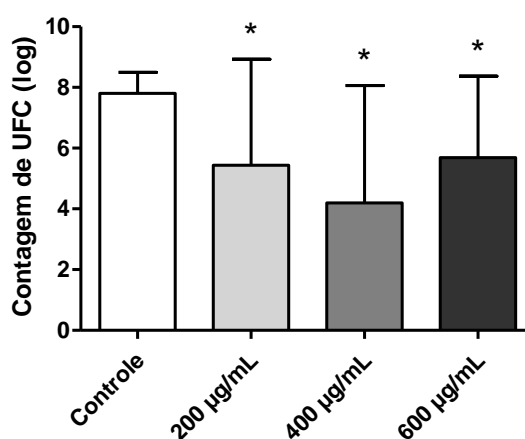


6.4 Impregnação dos fragmentos de cateter com clorpromazina e efeito da impregnação sobre a formação de biofilmes pelos isolados do estudo

A processo de impregnação dos fragmentos de cateter de Foley foi padronizado, testado e comprovado em um estudo anterior (SIDRIM *et al.*, 2019).

A clorpromazina, em todas as concentrações testadas, impregnada em fragmentos de cateter de Foley, foi capaz de inibir significativamente ($P < 0,05$) a formação de biofilmes por isolados de *E. coli*, *K. pneumoniae*, *P. mirabilis* e *P. aeruginosa*. A concentração de 200 $\mu\text{g/mL}$ inibiu até 57% a formação dos biofilmes, já a concentração de 400 $\mu\text{g/mL}$, inibiu em 71%, sendo a maior inibição observada. Por último, a maior concentração utilizada, 600 $\mu\text{g/mL}$, foi capaz de reduzir significativamente ($P < 0,05$), em até 56%, a formação dos biofilmes sobre os fragmentos de cateter quando comparados ao controle de crescimento, sendo a menor inibição observada (**Gráfico 06**).

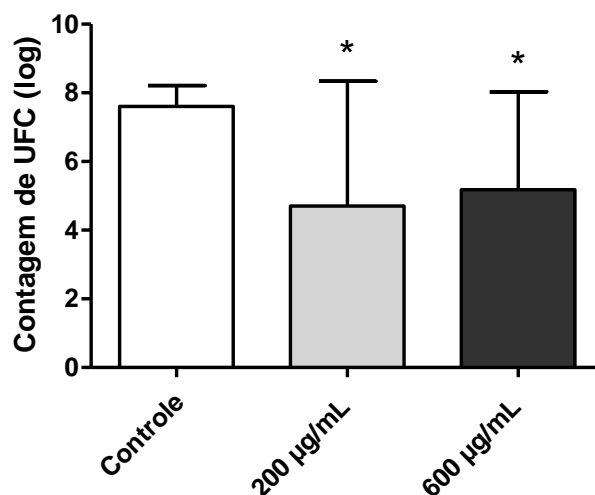
Gráfico 06 – Efeito da impregnação de cateteres de Foley com clorpromazina (200 $\mu\text{g/mL}$; 400 $\mu\text{g/mL}$ e 600 $\mu\text{g/mL}$) sobre a formação de biofilmes por *E. coli*, *K. pneumoniae*, *P. mirabilis* e *P. aeruginosa*. Dados expressos como média e desvio padrão de log da contagem de UFC/fragmento de cateter. Dados da clorpromazina na concentração de 400 $\mu\text{g/mL}$ para *E. coli*, *K. pneumoniae* e *P. mirabilis* foram extraídos de Sidrim *et al.*, (2019).



Analisando de forma estratificada, a CPZ inibiu a formação de biofilmes dos bacilos Gram negativos de forma bastante eficaz e semelhante. Na concentração de 200 $\mu\text{g/mL}$, houve uma redução de 38,2% na contagem de UFC/mL e na de 600 $\mu\text{g/mL}$, que

apresentou uma redução parecida na contagem de UFC/mL, houve uma redução de 32,0% quando comparada ao controle de crescimento (**Gráfico 07**).

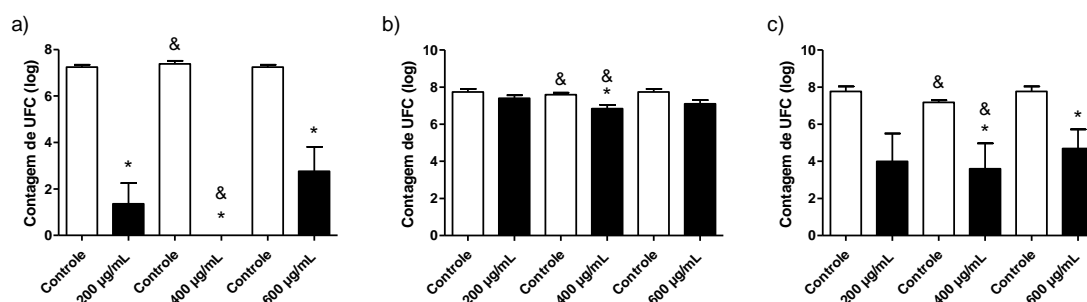
Gráfico 07 – Efeito da impregnação de cateteres de Foley com clorpromazina (CPZ a 200 µg/ mL e 600 µg/mL) sobre a formação de biofilmes por Enterobacteriaceae. Dados expressos como média e desvio padrão de log da contagem de UFC/cateter.



Observando-se cada espécie bacteriana, foi possível observar que nem todas as concentrações impregnadas nos fragmentos de cateter foram capazes de reduzir ($P < 0,05$) as contagens de UFC/fragmento de cateter. A maior concentração testada (600 µg/mL) foi a que apresentou redução significativa para todos os isolados, assim como a concentração de 400 µg/mL realizada no estudo anterior (SIDRIM *et al.*, 2019). Os isolados de *E. coli* foram os únicos que apresentaram redução em todas as concentrações testadas, sendo de 100% na concentração de 400 µg/mL (**Gráfico 08**).

Já para os isolados de *P. mirabilis*, somente na concentração de 600 µg/mL foi possível observar uma redução estatisticamente significativa ($P < 0,05$) das contagens de UFC/fragmento de cateter, sendo de 39,6%, quando comparado com o controle de crescimento. Apesar de não apresentar diferença estatística, é possível observar uma tendência de redução nas contagens de UFC/fragmento de cateter na concentração de 200 e 600 µg/mL, para os isolados de *K. pneumoniae* (**Gráfico 08**).

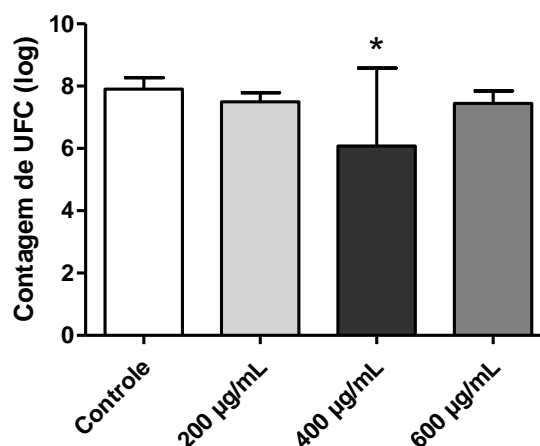
Gráfico 08 – Efeito da impregnação de cateteres de Foley com clorpromazina sobre a formação de biofilmes por Enterobacteriaceae. a) *E. coli* com CPZ a 200, 400 e 600 $\mu\text{g/mL}$; b) *K. pneumoniae* com CPZ a 200, 400 e 600 $\mu\text{g/mL}$; c) *P. mirabilis* com CPZ a 200, 400 e 600 $\mu\text{g/mL}$. Dados expressos como média e desvio padrão de log da contagem de UFC/cateter.



&: Resultados extraídos de estudo anterior (SIDRIM *et al.*, 2019).

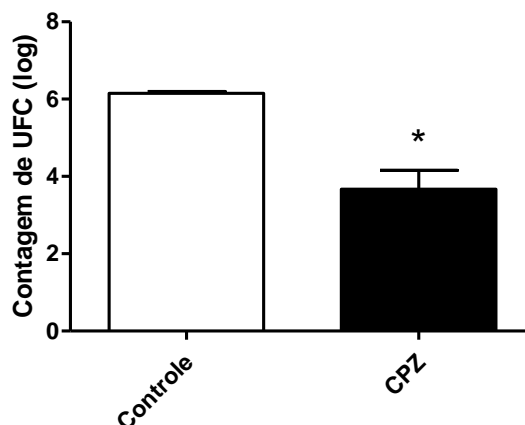
Analisando a ação da CPZ sobre a formação de biofilmes por isolados de *P. aeruginosa*, isoladamente, é possível observar uma redução estatisticamente significativa ($P < 0,05$) somente na concentração de 400 $\mu\text{g/mL}$, quando comparada ao controle de crescimento (**Gráfico 09**).

Gráfico 09 – Efeito da impregnação de cateteres de Foley com clorpromazina (CPZ a 200 $\mu\text{g/mL}$, 400 $\mu\text{g/mL}$ e 600 $\mu\text{g/mL}$) sobre a formação de biofilmes por *P. aeruginosa*. Dados expressos como média e desvio padrão de log da contagem de UFC/cateter.



Já para os isolados de *Candida* spp., a clorpromazina, na concentração de 400 µg/mL, impregnadas em fragmentos de cateter de Foley, foi capaz de inibir significativamente ($P < 0,05$) a formação de biofilmes por todos os isolados incluídos no estudo. A redução na contagem de colônias foi de 40,32%, quando comparadas ao controle de crescimento (**Gráfico 10**).

Gráfico 10 – Efeito da impregnação de cateteres de Foley com clorpromazina (400 µg/mL) sobre a formação de biofilmes por *Candida* spp. Dados expressos como média e desvio padrão do log da contagem de UFC/cateter.



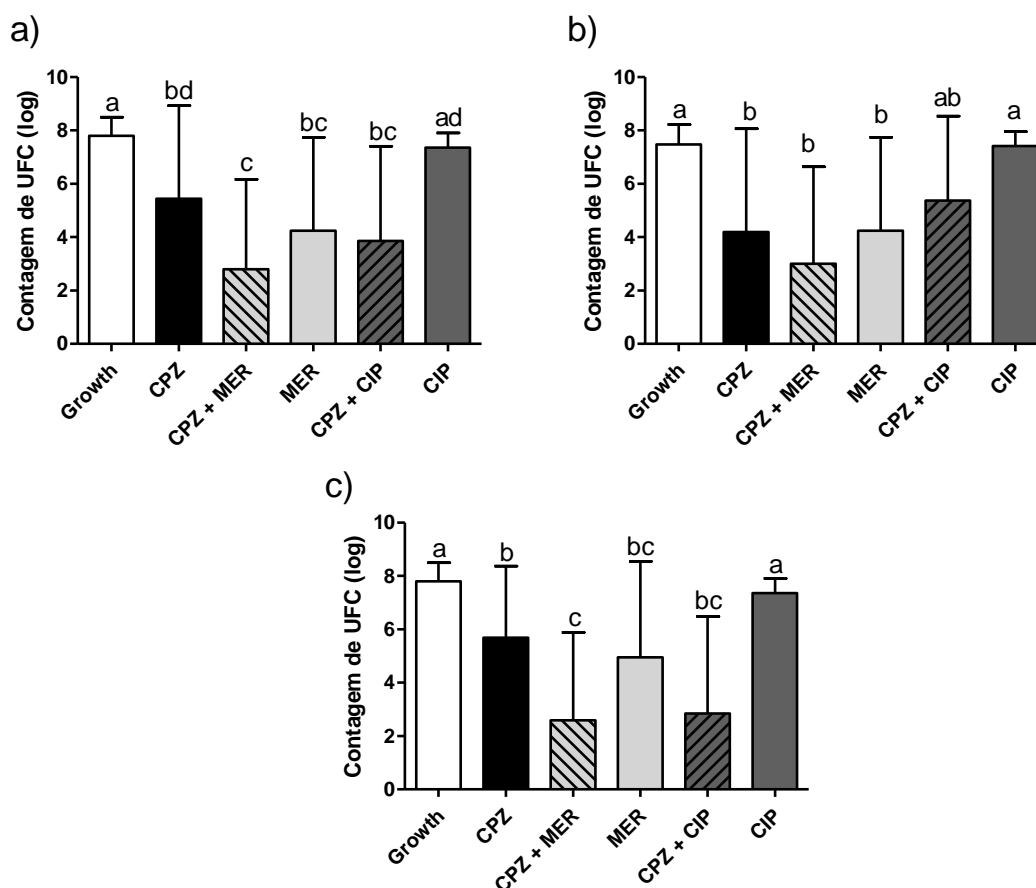
6.5 Ação dos antimicrobianos sobre biofilmes maduros dos isolados do estudo formados em fragmentos cateteres impregnados com clorpromazina

Para avaliar um possível sinergismo entre os antimicrobianos escolhidos para o estudo com a clorpromazina, foi realizado o experimento combinando os fragmentos impregnados na presença dos antimicrobianos. As concentrações utilizadas na impregnação dos fragmentos foram 200, 400 e 600 µg/mL, sendo que as concentrações de 200 e 600 µg/mL foram utilizadas para os isolados de *E. coli*, *K. pneumoniae*, *P. mirabilis* e *P. aeruginosa* e a concentração de 400 µg/mL para *P. aeruginosa* e para os isolados de *Candida* spp., pois foi testado em um estudo anterior a concentração de 400 µg/mL para os bacilos Gram negativos (SIDRIM *et al.*, 2019).

Em todas as concentrações utilizadas no estudo, a CPZ impregnada nos fragmentos de cateter, bem como MER reduziram ($P < 0,05$) a contagem de UFC/fragmento de cateter, quando comparada àquela do controle de crescimento. A combinação de CPZ e MER resultou na maior redução, em todas as três concentrações.

Não houve redução nos biofilmes formados em fragmentos de cateter não impregnados na presença da CIP, mas houve uma redução ($P < 0,05$) nos biofilmes formados em fragmentos de cateter impregnados com CPZ na presença de CIP. A maior concentração de CPZ utilizada ($600 \mu\text{g/mL}$), combinada com a CIP, foi capaz de causar uma redução significativa ($P < 0,05$) nos biofilmes formados em fragmentos impregnados, quando comparados aos fragmentos não impregnados na presença da CIP e ao controle de crescimento (**Gráfico 11**).

Gráfico 11 - Efeito dos antimicrobianos ciprofloxacina (CIP) e meropenem (MER) em biofilmes maduros de *E. coli* ($n=2$), *K. pneumoniae* ($n=3$), *P. mirabilis* ($n=2$) e *P. aeruginosa* ($n=2$) crescidos sobre fragmentos de cateteres impregnados com clorpromazina (CPZ) a a) $200 \mu\text{g/mL}$, b) $400 \mu\text{g/mL}$ e c) $600 \mu\text{g/mL}$. Controle: fragmentos de cateter não impregnados. Dados expressos como média e desvio padrão de log da contagem de UFC/cateter.

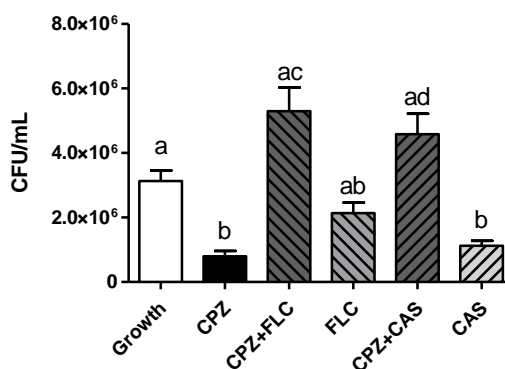


Para os isolados fúngicos, foi possível observar que houve uma redução na contagem de UFC/mL, quando comparada ao controle de crescimento, sempre que na

presença de CPZ, seja isoladamente ou em combinação com os antifúngicos incluídos na pesquisa.

Analisando de forma individualizada, não houve sinergismo nas combinações propostas, visto que o fragmento de cateter impregnado com CPZ e sem adição de antifúngico apresentou a maior redução na contagem de UFC/mL ($P < 0,05$), quando comparada ao controle de crescimento e os demais, FLC e CAS, apesar de haver uma redução quando comparadas com CPZ+FLC e CPZ+CAS ($P < 0,05$), respectivamente. Não houve diferença estatística comparado com os fragmentos impregnados na ausência de antifúngico (**Gráfico 12**).

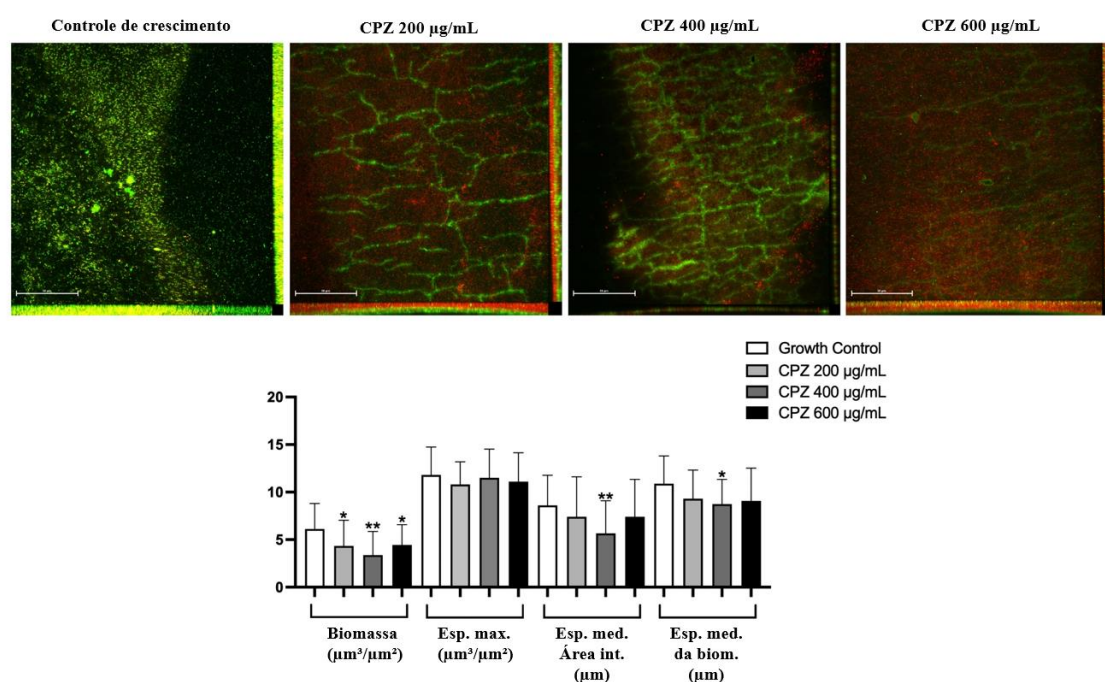
Gráfico 12 - Efeito dos antifúngicos Fluconazol (FLC) e Caspofungina (CAS) sobre os biofilmes maduros de *Candida* spp. ($n=7$) crescidos em cateteres impregnados com clorpromazina (CPZ) a 400 $\mu\text{g/mL}$. Controle: fragmentos de cateter não impregnados. Dados expressos como média e desvio padrão da contagem de ufc's por cateter.



6.6 Análise da microscopia confocal dos biofilmes dos isolados do estudo formados em fragmentos de cateteres impregnados com clorpromazina, combinados ou não com antimicrobianos.

A análise das imagens por microscopia confocal, de modo geral, demonstraram, além de uma menor espessura de biofilme, biofilmes com células não viáveis (coradas em vermelho) nos fragmentos impregnados quando comparados aos controles não impregnados, evidenciando o que já foi mencionado nas seções anteriores, com ênfase para a *P. aeruginosa* (PATCC), que apresentou menor viabilidade celular em biofilmes formados em todas as concentrações testadas e uma maior redução ($P < 0,5$) da biomassa na concentração de 400 $\mu\text{g/mL}$ (**Figura 9**).

Figura 9. Análise da microscopia confocal de biofilmes maduros da *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 29213 (PATCC) crescidos em cateteres impregnados com concentrações de 200, 400 ou 600 $\mu\text{g/mL}$ de clorpromazina (CPZ). Controle de crescimento: fragmento de cateter não impregnado. Dados expressos como média e desvio padrão dos valores obtidos para os seguintes parâmetros: espessura máxima, biomassa, espessura média da biomassa e espessura média área total. *indica diferenças estatisticamente significativas entre cateteres impregnados com CPZ e controle não impregnado ($P < 0,05$).



Além disso, a análise da microscopia confocal da *E. coli* evidenciou uma redução estatisticamente significativa ($P < 0,001$) na espessura média da biomassa em todas as concentrações testadas. Apesar de não haver uma redução visível na biomassa, foi possível observar uma diferença clara entre células viáveis (coradas em verde) e não viáveis (coradas em vermelho), na qual, na maior concentração testada (600 $\mu\text{g/mL}$) existe uma predominância de células não viáveis (**Figura 10**). Isso demonstra que o composto teve ação antimicrobiana. O mesmo pôde ser observado na análise da microscopia confocal do *P. mirabilis*, sendo visível o aumento de células não viáveis e a diminuição da espessura máxima à medida que a concentração aumenta (**Figura 11**).

Figura 10. Análise da microscopia confocal de biofilmes maduros da *Escherichia coli* enteroagregativa (EAEC) crescidos em cateteres impregnados com concentrações de 200 ou 600 $\mu\text{g/mL}$ de clorpromazina (CPZ). Controle de crescimento: fragmento de cateter não impregnado. Dados expressos como média e desvio padrão dos valores obtidos para os seguintes parâmetros: espessura máxima, biomassa, espessura média da biomassa e espessura média área total. *indica diferenças estatisticamente significativas entre cateteres impregnados com CPZ e controle não impregnado ($P < 0,05$).

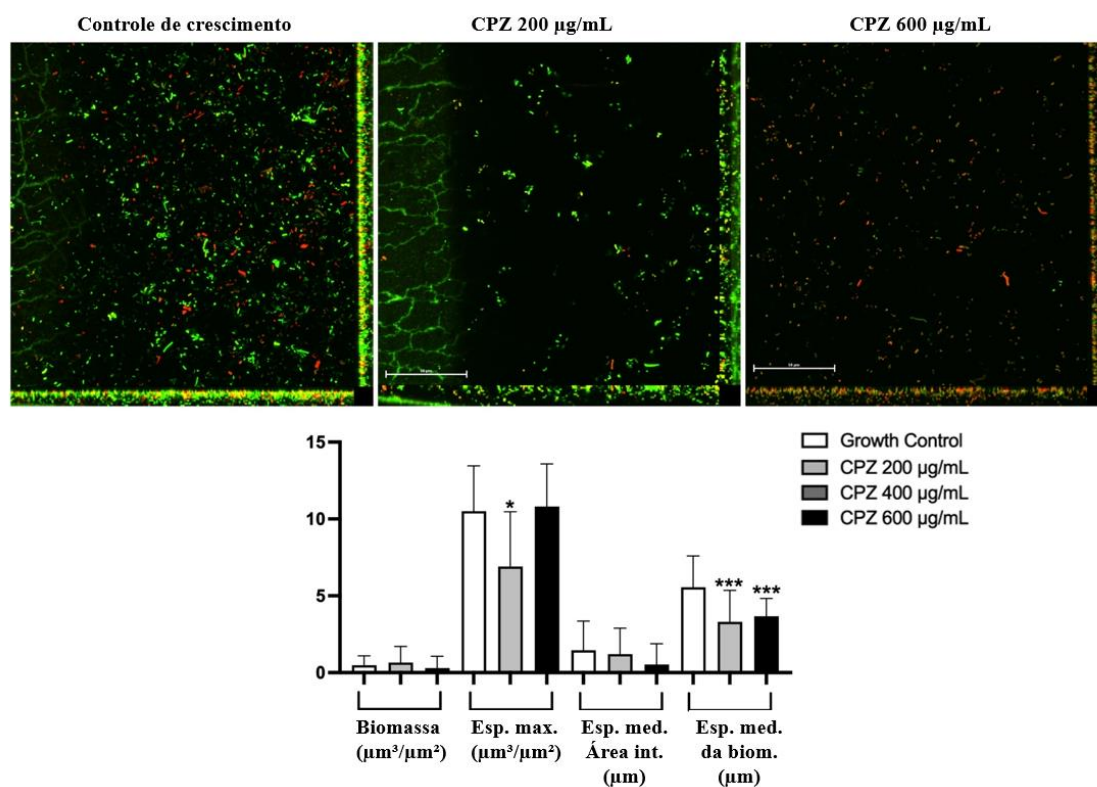
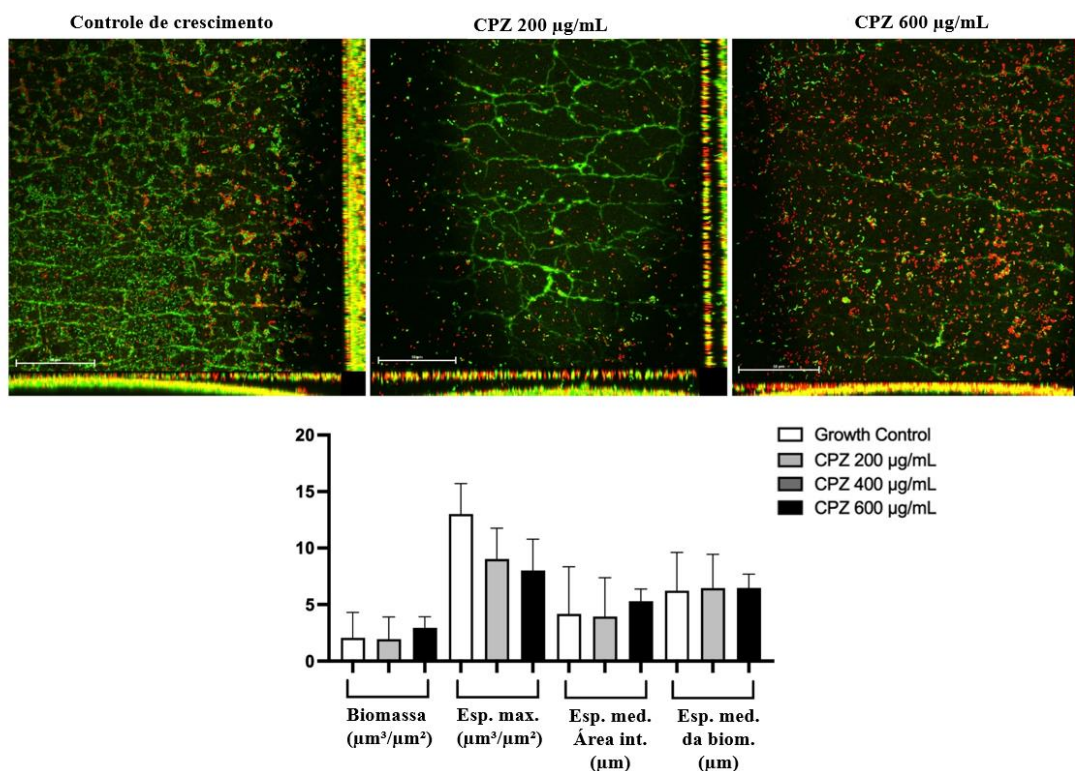
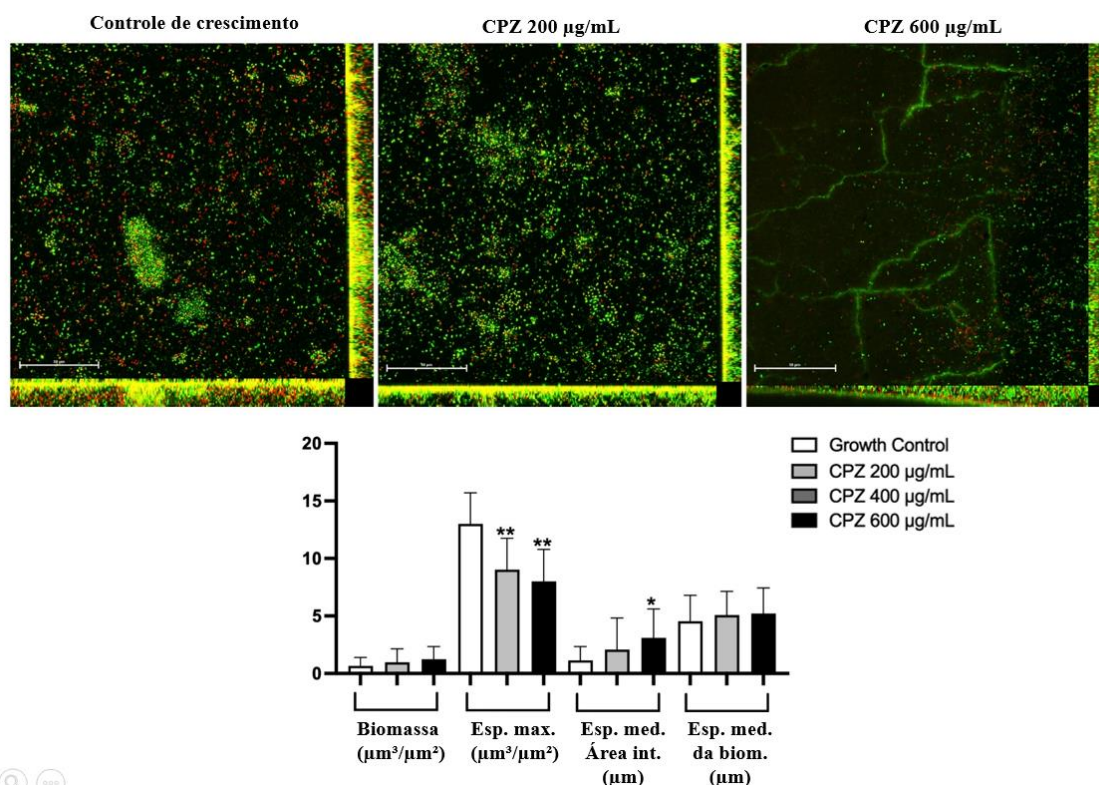


Figura 11. Análise da microscopia confocal de biofilmes maduros da *Proteus mirabilis* ATCC 29906 (PRAT) crescidos em cateteres impregnados com concentrações de 200 ou 600 $\mu\text{g/mL}$ de clorpromazina (CPZ). Controle de crescimento: fragmento de cateter não impregnado. Dados expressos como média e desvio padrão dos valores obtidos para os seguintes parâmetros: espessura máxima, biomassa, espessura média da biomassa e espessura média área total. *indica diferenças estatisticamente significativas entre cateteres impregnados com CPZ e controle não impregnado ($P < 0,05$).



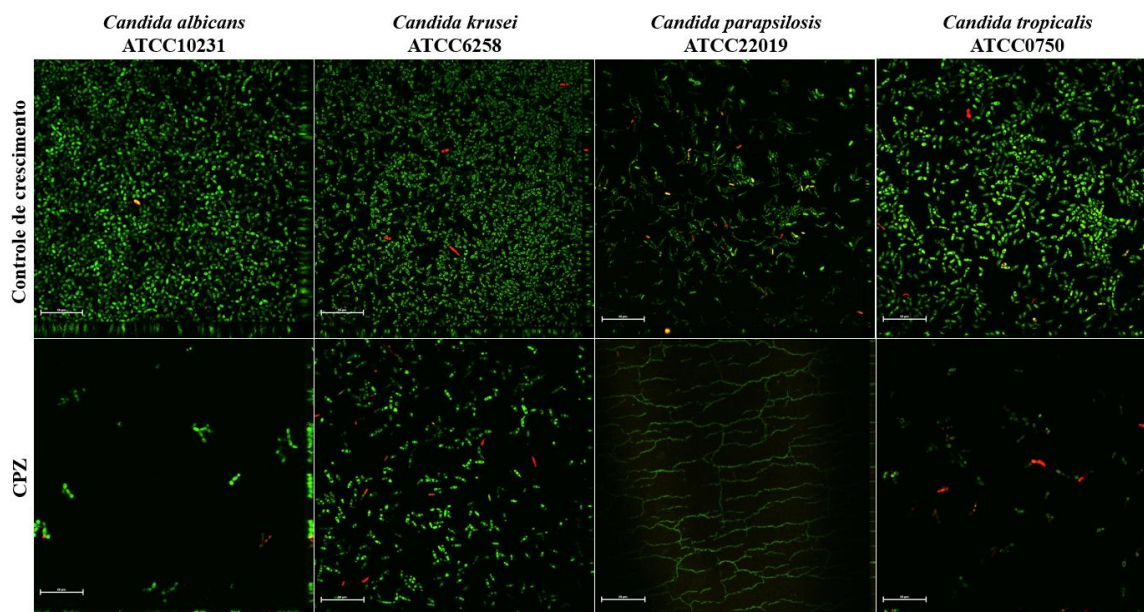
Além disso, a análise da microscopia confocal evidenciou que a impregnação com CPZ reduziu significativamente ($P < 0,05$) a espessura máxima em todas as concentrações testadas para a *K. pneumoniae* (KLAT), porém, diferente das demais, não houve um aumento visível de células não viáveis quando comparadas ao controle de crescimento (**Figura 12**).

Figura 12. Análise da microscopia confocal de biofilmes maduros da *Klebsiella pneumoniae* ATCC 600703 (KLAT) crescidos em cateteres impregnados com concentrações de 200 ou 600 $\mu\text{g/mL}$ de clorpromazina (CPZ). Controle de crescimento: fragmento de cateter não impregnado. Dados expressos como média e desvio padrão dos valores obtidos para os seguintes parâmetros: espessura máxima, biomassa, espessura média da biomassa e espessura média área total. *indica diferenças estatisticamente significativas entre cateteres impregnados com CPZ e controle não impregnado ($P < 0,05$).



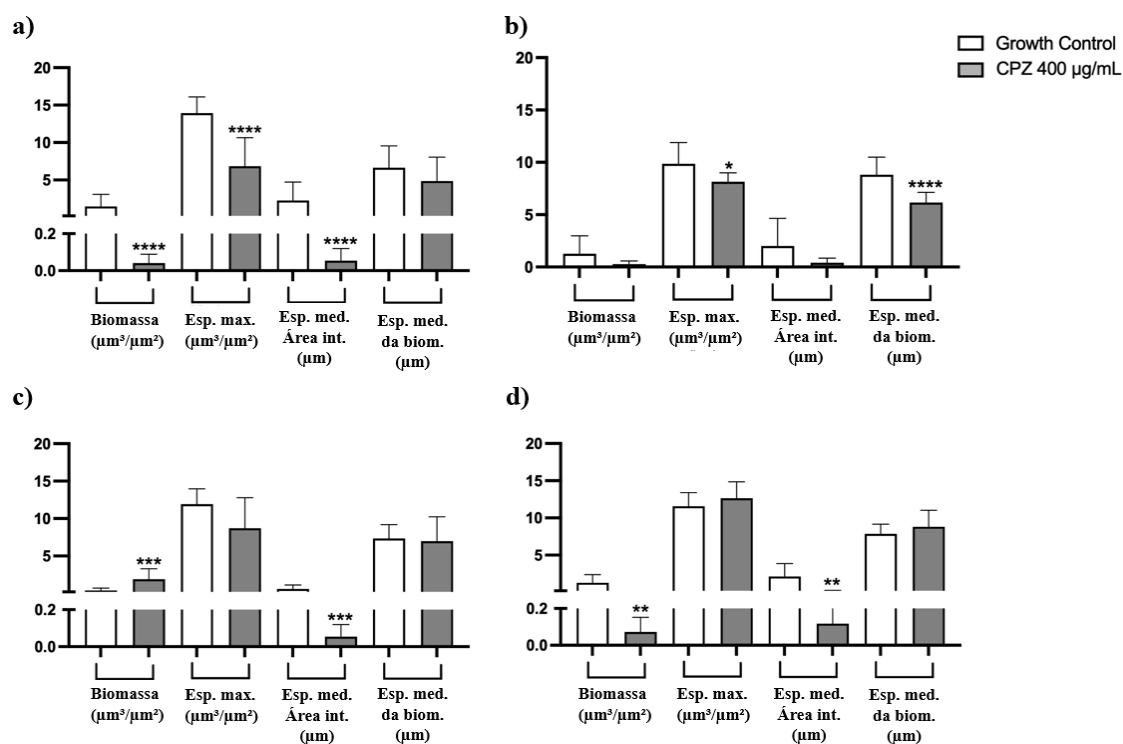
Analisando as imagens por microscopia confocal dos biofilmes de *Candida* spp., foi possível observar, em todos os isolados testados, uma menor quantidade de células viáveis nos fragmentos impregnados, quando comparados aos controles não impregnados. Em alguns casos, como nas imagens da *Candida albicans* e *Candida tropicalis*, houve uma redução de quase 100% nos biofilmes. (Figura 13).

Figura 13. Biofilmes maduros de *Candida albicans*, *Candida krusei*, *Candida parapsilosis* e *Candida tropicalis* crescidos em fragmentos de cateteres impregnados com clorpromazina (CPZ). Observar a redução global na quantidade de células (pontos verdes) aderidas ao cateter impregnado com CPZ, quando comparado com o controle de crescimento não impregnado. Ampliação de 600X, escala de 50 μ m, imagens geradas com laser de 488 nm (SYTO9). Pontos vermelhos indicam células inviáveis ou mortas.



As análises das imagens também evidenciaram que para a cepa de *C. albicans* houve uma redução estatisticamente significativa ($P < 0,001$) na biomassa, na espessura máxima e na espessura média (**Gráfico 13**). Apesar de haver uma redução visível na biomassa nas imagens obtidas, não houve uma redução estatisticamente significativa na biomassa das cepas de *C. krusei*, o mesmo pode ser observado para a *C. parapsilosis*. A *C. tropicalis* apresentou uma redução ($P < 0,01$) tanto na biomassa, quanto na espessura média dos biofilmes, formados nos fragmentos impregnados (**Gráfico 13**). Isso corrobora que a CPZ possui ação antibiofilme, pois é possível observar nas imagens que não houve a presença de células não viáveis, coradas em vermelho (**Figura 13**).

Gráfico 13 – Análise da microscopia confocal de biofilmes maduros de *Candida albicans*, *Candida krusei*, *Candida parapsilosis* e *Candida tropicalis* crescidos em cateteres impregnados com clorpromazina (CPZ). Controle de crescimento: fragmento de cateter não impregnado. Dados expressos como média e desvio padrão dos valores obtidos para os seguintes parâmetros: espessura máxima, biomassa, espessura média da biomassa e espessura média área total. *indica diferenças estatisticamente significativas entre cateteres impregnados com CPZ e controle não impregnado ($P < 0,05$). a) *Candida albicans*, b) *Candida krusei*, c) *Candida parapsilosis* e d) *Candida tropicalis*.



7. DISCUSSÃO

A busca por novas estratégias para combater biofilmes é extremamente abordada em pesquisas, sendo o reposicionamento de fármacos que possuem ação antimicrobiana, mas utilizados clinicamente para outras finalidades uma das principais estratégias estudadas (BARBAROSSA *et al.*, 2022; SIDRIM *et al.*, 2017), pois o desenvolvimento de novos antimicrobianos demanda tempo e mesmo que chegue na fase clínica, pode apresentar falhas e não ser aprovado para uso clínico (ASHBURN; THOR, 2004).

A CPZ é uma fenotiazina muito utilizada como antipsicótico, mas também possui atividade antimicrobiana, como outras fenotiazinas, como a prometazina, tioridazina e trifluoperazina (LAGADINOU *et al.*, 2020), tendo se mostrado uma eficaz estratégia no combate a biofilmes microbianos, pois além do seu poder antimicrobiano, ela também atua como um inibidor de bomba de efluxo (AMARAL *et al.*, 2001; CALDARA; MARMIROLI, 2021; SIDRIM *et al.*, 2017; SIDRIM *et al.*, 2019). As bombas de efluxo são importantes proteínas transmembranares que atuam como transportadoras de metabólitos importantes para a fisiologia microbiana, além de secretarem moléculas autoindutoras responsáveis pelo quorum sensing microbiano e de ejetarem antimicrobianos para o meio extracelular, tornando esses microrganismos resistentes a diversas drogas (ANDERSEN *et al.*, 2015).

As CIMs da CPZ contra os isolados de *P. aeruginosa* foram 312,5 µg/mL para 5/6 cepas testadas. Somente um isolado incluído no estudo apresentou uma CIM diferente dos demais, de 625 µg/mL. Esses resultados corroboram aqueles do estudo de Nehme *et al.*, (2018), no qual foram observadas CIMs de CPZ contra *P. aeruginosa* variando de 256 a 1024 µg/mL. Quando comparados a estudos anteriores com outras espécies bacterianas, pode-se observar que as CIMs de CPZ contra *P. aeruginosa* foram maiores que as CIMs contra isolados de *E. coli* e *K. pneumoniae*, porém, menores, de forma geral, que as de *P. mirabilis* (SIDRIM *et al.*, 2019). Já para os isolados de *Candida* spp., a maior CIM da CPZ observada no estudo foi de 39,06 µg/mL, porém, as CIMs variaram não só entre isolados de espécies distintas, mas, também, entre isolados da mesma espécie, o que podemos observar em outros estudos, como o de Galgóczy *et al.*, (2011), que testou a CPZ contra doze espécies de *Candida* sp., obtendo CIMs que variaram entre 12,5 e 50,0 µg/mL. Foi possível observar em outros estudos, inclusive pesquisas que utilizam a CPZ em ensaios com patógenos não fúngicos, que os valores de CIM da CPZ contra esses microrganismos são valores muitas

vezes baixos, demonstrando seu alto poder antimicrobiano (WOOD, NUGENT, 1985; SIDRIM *et al.*, 2019; FIALLOS *et al.*, 2022).

Além disso, a CEMB da CPZ contra os isolados de *P. aeruginosa* foram 2x maiores que a CIM para os mesmos isolados testados. A maior tolerância de biofilmes de *P. aeruginosa* à CPZ pode estar associada a diversos fatores, como a presença de células persistentes, baixa permeabilidade causada pela presença de uma matriz extracelular e a expressão de bombas de efluxo, um dos fatores importantes para o aumento da tolerância a drogas em microrganismos em seu estado planctônico e sésil (CASTANEDA *et al.*, 2016). O mesmo pôde ser observado para os isolados de *Candida* spp., de forma que a SMIC90 da CPZ variou de 39,06 – 156,25 µg/mL, sendo em alguns casos até três vezes maior que a CIM contra o mesmo isolado. Biofilmes proporcionam aos microrganismos um ambiente de proteção, tornando-os mais resistentes a estresses externos, como a ação de antimicrobianos, podendo aumentar a resistência em até mil vezes a esses compostos, quando comparados a sua fase planctônica (CASTANEDA *et al.*, 2016; POLONI; ROTTA, 2020).

Baugh *et al.*, (2014) demonstraram que a CPZ foi capaz de inibir, em mais de 50%, a formação de biofilmes *in vitro* por *P. aeruginosa*, na concentração de 512 µg/mL. Mesmo utilizando uma concentração menor, em nosso estudo, a CPZ também inibiu a formação de biofilmes *in vitro* em todas as concentrações testadas, sendo a maior redução observada quando utilizou-se a concentração de 312,5 µg/mL, reduzindo 60% da biomassa dos biofilmes testados. A ação antibiofilme da CPZ pode ser atestada, pois em concentrações menores que a CIM da CPZ para cada isolado, foi possível observar a redução na formação do biofilme, corroborando com o estudo anteriormente realizado com *E. coli*, *K. pneumoniae* e *P. mirabilis*, na qual, a CIM e concentrações subinibitórias inibiram a formação de biofilmes *in vitro* (SIDRIM *et al.*, 2019; AGUILAR-VEJA *et al.*, 2021).

A CPZ, assim como outras fenotiazinas, possui ação antibiofilme já descrita por atuar na inibição de bombas de efluxo (AGUILAR-VEJA *et al.*, 2021; GRIMSEY *et al.*, 2020). Nosso estudo demonstrou que a CPZ também reduziu a biomassa dos biofilmes de espécies de *Candida* spp., em todas as concentrações testadas, chegando a uma inibição de até 66% da formação de biofilmes, tal achado foi corroborado pela comparação com o estudo de Fiallos *et al.*, (2022), que demonstraram uma redução na biomassa de 100% nos biofilmes de *C. albicans* na presença de CPZ. A ação da CPZ sobre as bombas de efluxo pode ser atestada, visto que outros estudos demonstraram uma inibição dessas proteínas transmembranares na presença de fenotiazinas, como no estudo de Brilhante *et al.*, 2017, que utilizaram a

prometazina e demonstraram sua ação em bombas de efluxo de *C. tropicalis* (SIDRIM *et al.*, 2017). A CPZ também demonstra ação no ciclo celular de *Candida* sp., interferindo no processo de divisão celular através da síntese de DNA (SHARMA, KAUR, KHULLER, 2001). Ademais, outro estudo demonstrou que, ao inibir quimicamente as bombas de efluxo dos patógenos inclusos na pesquisa, potencializou a ação de compostos testados, tornando os microrganismos mais sensíveis, enfatizando a importância dessas proteínas para o aumento na resistência dos microrganismos (VIKRAM, BOMBERGER, BIBBY, 2015). Toda essa capacidade diversa da CPZ de atuar em diferentes frentes no ciclo celular, seja em bombas e efluxo, seja interferindo na síntese de DNA, corroboram com seu poder tanto na formação de biofilmes, quanto sobre biofilmes maduros.

O revestimento ou impregnação de dispositivos médicos com compostos antimicrobianos ou com ação antibiofilme demonstrou ótimos resultados no combate a infecções associadas a esses dispositivos, inclusive sendo recomendado por diretrizes internacionais (BELFIELD *et al.*, 2019; FISHER *et al.*, 2015; LORENTE, 2016; TENKE *et al.*, 2008). Em nosso estudo, nas diferentes concentrações utilizadas, a CPZ impregnada nos fragmentos de cateter reduziu a formação de biofilmes por todos os uropatógenos, sendo a menor redução observada para os isolados de *P. aeruginosa*. Tal comportamento também foi observado em outro estudo que testou a impregnação de cateteres com compostos antibiofilme (BPA - cloreto de benzalcônio, ácido poliacrílico e glutaraldeído) para inibição da formação de biofilmes por diferentes uropatógenos, no qual houve uma redução total de biofilmes de *E. coli*, mas não houve uma redução nos biofilmes de *P. aeruginosa* (NAVARRO *et al.*, 2022). Pode-se sugerir que, dentre outros fatores associados a biofilmes, no presente estudo, a maior expressão de bombas de efluxo em isolados de *P. aeruginosa* pode estar envolvida nessa maior resistência ao composto. Tal hipótese pode ser reforçada com o estudo do Vikram, Bomberger e Bibby, (2015), no qual avaliaram a ação do glutaraldeído contra espécies de *Pseudomonas* spp. sem sucesso, mas destacaram que ao inibir quimicamente a expressão de bombas de efluxo, houve uma potencialização da ação do glutaraldeído na inibição da formação de biofilmes por essas espécies.

A CPZ, impregnada em fragmentos de cateter de Foley, também inibiu a formação de biofilmes por todos os isolados de *Candida* spp.. Kart *et al.*, 2017, também estudaram a ação de compostos impregnados em fragmentos de cateter, com redução na formação de biofilmes por *C. albicans* nesses fragmentos, demonstrando que a estratégia de impregnação de cateteres com compostos antibiofilme são promissoras na prevenção de infecções. Além

disso, outro estudo demonstrou a ação da CPZ impregnada em fragmentos de cateter inibindo biofilmes bacterianos (SIDRIM *et al.*, 2019). Os achados corroboraram para reforçar o uso da clorpromazina como agente antimicrobiano e antibiofilme, pois, em diversas pesquisas, ela demonstrou seu abrangente potencial antimicrobiano e antibiofilme, contra bactérias Gram positivas, Gram negativas, bacilos álcool ácido resistentes, patógenos fúngicos e até parasitos (AMARAL; LORIAN, 1991; DASTIDAR *et al.*, 2013; GRIMSEY, PIDDOCK, 2019; FIALLOS *et al.*, 2022; GALGÓCZY *et al.*, 2011; WOOD, NUGENT, 1985; ZILBERSTEIN, LIVEANU, 1990).

Para os bacilos Gram negativos, no estudo de Sidrim *et al.*, (2019), a concentração de 400 µg/mL, impregnada em fragmentos de cateter, inibiu em mais de 50% a formação de biofilmes nesses dispositivos médicos. Tal achado demonstrou que a melhor concentração para impregnação desses fragmentos de cateter é a de 400 µg/mL, pois, em presente estudo, a concentração de 200 µg/mL inibiu em 38% a formação dos biofilmes desses enteropatógenos, enquanto a concentração de 600 µg/mL inibiu em 32%. Já para os isolados de *P. aeruginosa*, em nosso estudo atual, a concentração de 400 µg/mL foi a única capaz de inibir ($P < 0,05$) a formação de biofilmes, reforçando nossa hipótese de que essa seja a concentração ideal para impregnação de cateteres como estratégia para combate a biofilmes pelos microrganismos do estudo. O uso de inibidores de bomba de efluxo demonstra ser uma estratégia eficaz para combater biofilmes, seja por ter ação antimicrobiana, seja inibindo a formação de biofilmes (NEHME *et al.*, 2018; BRILHANTE *et al.*, 2018).

Além do potencial antimicrobiano da CPZ já ser amplamente conhecido, esse composto ainda demonstra que pode agir como um potencializador de antimicrobianos clássicos, agindo muitas vezes de forma sinérgica, aumentando a sensibilidade dos patógenos a determinados antimicrobianos, como o estudo de Mohammed *et al.*, (2020), no qual isolados de *Acinetobacter* sp. apresentaram maior sensibilidade a antimicrobianos, em até 90%, quando combinados com a CPZ (CHAN; ONG; CHUA; 2007; KRISTIANSEN *et al.*, 2006; SIDRIM *et al.*, 2019). Em presente estudo, é possível observar uma maior redução dos biofilmes bacterianos, quando foi associado a CIM do meropenem com os fragmentos de cateter impregnados com CPZ, indicando uma possível ação potencializadora da CPZ. Porém, os efeitos sinérgicos, nem sempre são observados, como no estudo de Galgóczy *et al.*, (2011), que constataram que a CPZ, em altas concentrações, atuou de forma antagônica com a anfotericina B contra *Candida* sp. Em presente ensaio de combinação CPZ-antifúngico, observou-se que a combinação da CPZ com ambos os fármacos testados não apresentou

sinergismo, corroborando os achados de Galgóczy *et al.*, (2009), que avaliaram a combinação de algumas fenotiazinas com a anfotericina B contra agentes de zigomicose, não observado sinergismo.

8. CONCLUSÕES

- A clorpromazina inibiu a formação de biofilmes *in vitro* por *E. coli*, *K. pneumoniae*, *P. mirabilis*, *P. aeruginosa* e *Candida* spp. incluídos no estudo, demonstrando uma alta capacidade como agente antibiofilme;
- A clorpromazina, impregnada em fragmentos de cateter, nas concentrações de 200 e 600 µg/mL, inibiu a formação de biofilmes de *E. coli*, porém, somente a concentração de 600 µg/mL foi capaz de reduzir a contagem de UFC/mL de biofilmes de *K. pneumoniae* e *P. mirabilis*;
- A clorpromazina, somente na concentração de 400 µg/mL, impregnada em fragmentos de cateter, reduziu a formação de biofilmes por *P. aeruginosa* em cateteres impregnados, sendo a melhor concentração para impregnação dos fragmentos;
- A clorpromazina impregnada em cateteres, na concentração de 400 µg/mL, reduziu a formação de biofilmes por *Candida* spp., demonstrando sua ação em patógenos fúngicos;
- A clorpromazina, impregnada em fragmentos de cateter, potencializou a ação do meropenem, reduzindo os biofilmes maduros dos bacilos Gram negativos formados sobre os fragmentos impregnados;
- A clorpromazina não atuou de forma sinérgica quando combinada com os antifúngicos sobre os biofilmes maduros de *Candida* spp.

Dessa forma, a impregnação de cateteres de demora com a clorpromazina demonstra ser uma promissora estratégia no combate a infecções do trato urinário associados a dispositivo médicos. Mais estudos necessitam ser realizados para viabilizar o uso dessa estratégia antibiofilme na prática clínica.

9. REFERÊNCIAS

- ABI-SAID, D.; ANAISSIE, E.; UZUN, O.; RAAD, I.; PINZCOWSKI, H.; VARTIVARIAN, S. The epidemiology of hematogenous candidiasis caused by different *Candida* species. **Clin Infect Dis**, v. 24, n. 6, p. 1122-1128, 1997.
- ACHKAR, J.M.; FRIES, B.C. *Candida* infections of the genitourinary tract. **Clin. Microbiol. Rev**, v. 23, n. 1, p. 253–273. 2010.
- ADEDZE-KPODO, R.K.; FEGLO, P.K.; AGBOLI, E.; ASMAH, R.H.; KWADZOKPUI, P.K. Genotypic characterization of extended-spectrum β -lactamase producing urinary isolates among pregnant women in Ho municipality, Ghana. **Heliyon**, v. 8, n. 12, 2022.
- AGUILAR-VEJA, L.; LÓPEZ-JÁCOME, L.E.; FRANCO, B.; MUÑOZ-CARRANZA, S.; VARGAS-MAYA, N.; FRANCO-CENDEJAS, R.; HERNÁNDEZ-DURÁN, M.; OTERO-ZÚÑIGA, M.; CAMPO-BELEÑO, C.; JIMÉNEZ-CORTÉS, J.G.; MARTÍNEZ-VÁZQUEZ, M.; RODRÍGUEZ-ZAVALA, J.S.; MAEDA, T.; ZURABIAN, R.; GARCÍA-CONTRERAS, R. Antibacterial properties of phenothiazine derivatives against multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* strains. **J Appl Microbiol**, v. 131, n. 5, p. 2235-2243, 2021.
- AL-BADR, A.; AL-SHAIKH, G. Recurrent Urinary Tract Infections Management in Women: A review. **Sultan Qaboos Univ Med J**, v. 13, n. 3, p. 359-367, 2013.
- ALFOUZAN, W.A.; DHAR, R. Candiduria: evidence-based approach to management, are we there yet? **J Mycol Med**, v. 27, n. 3, p. 293-302, 2017.
- AMARAL, L.; KRISTIANSEN, J.E.; VIVEIROS, M.; ATOUGUIA, J. Activity of phenothiazines against antibiotic-resistant *Mycobacterium tuberculosis*: a review supporting further studies that may elucidate the potential use of thioridazine as anti-tuberculosis therapy. **J Antimicrob Chemother**, v. 47, n. 5, p. 505-511, 2001.
- AMARAL, L.; LORIAN, V. Effects of chlorpromazine on the cell envelope proteins of *Escherichia coli*. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 35, n. 9, p. 1923-1924, 1991.
- ANDERSEN, J.L.; HE, G.X.; KAKARLA, P.; K C,R.; KUMAR, S.; LAKRA, W.S.; et al. Multidrug efflux pumps from Enterobacteriaceae, *Vibrio cholerae* and *Staphylococcus aureus* bacterial food pathogens. **Int J Environ Res Public Health**, v.12, n. 2, p. 1487-1547, 2015.
- ANJU, V.T.; BUSI, S.; IMCHEN, M.; KUMAVATH, R.; MOHAN, M.S.; SALIM, S.A.; SUBHASWARAJ, P.; DYAVAIHAH, M. Polymicrobial infections and biofilms: clinical significance and eradication strategies. **Antibiotics**, v. 11, n. 1, p. 1731, 2022.
- ARMBRUSTER, C.E.; MOBLEY, H.L.T.; PEARSON, M.M. Pathogenesis of *Proteus mirabilis* Infection. **EcoSal Plus**, v. 8, n. 1, 2018.
- ASHBURN, T.T.; THOR, K.B. Drug repositioning: Identifying and developing new uses for existing drugs. **Nat. Rev. Drug Discov**, v. 3, n. 1, p. 673-683, 2004.

ASTANEDA, P.; MCLAREN, A.; TAVAZIVA, G.; OVERSTREET, D. Biofilm antimicrobial susceptibility increases with antimicrobial exposure time. **Clin Orthop Relat Res**, v. 474, n 1, p. 1659-1664, 2016.

AZAM, M.W.; KHAN, A.U. Updates on the pathogenicity status of *Pseudomonas aeruginosa*. **Drug Discov. Today**, v. 24, n. 1, p. 350–359, 2019.

BAILEY, A.M.; PAULSEN, I.T.; PIDDOCK, L.J. RamA confers multidrug resistance in *Salmonella enterica* via increased expression of *acrB*, which is inhibited by chlorpromazine. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 52, n. 10, p. 3604-3611, 2008.

BANDEIRA, T.D.E.J.; BRILHANTE, R.S.; ROCHA, M.F.; MOREIRA, C.A.; CORDEIRO, R.D.E.A.; RIBEIRO, J.F.; CASTELO-BRANCO, D.D.E.S.; SIDRIM, J.J. *In vitro* antimicrobial susceptibility of clinical and environmental strains of *Burkholderia pseudomallei* from Brazil. **Int J Antimicrob Agents**, v. 42, n. 4, p. 375-377, 2013.

BARBAROSSA, A.; ROSATO, A.; CORBO, F.; CLODOVEO, M.L.; FRACCHIOLLA, G.; CARRIERI, A.; CAROCCI, A. Non-Antibiotic Drug Repositioning as an Alternative Antimicrobial Approach. **Antibiotics (Basel)**, v. 11, n. 6, p. 816, 2022.

BELFIELD, K.; CHEN, X.; SMITH, E.F.; ASHRAF, W.; BAYSTON, R. An antimicrobial impregnated urinary catheter that reduces mineral encrustation and prevents colonisation by multi-drug resistant organisms for up to 12 weeks. **Acta Biomater**, v. 90, n. 1, p. 157-168, 2019.

BENGOECHEA, J.A.; SA PESSOA, J. *Klebsiella pneumoniae* infection biology: living to counteract host defences. **FEMS Microbiol Rev**, v. 43, n. 2, p. 123-144, 2019.

BJARNSHOLT, T.; BUHLIN, K.; DUFRÊNE, Y.F.; GOMELSKY, M.; MORONI, A.; RAMSTEDT, M.; RUMBAUGH, K.P.; SCHULTE, T.; SUN, L.; ÅKERLUND, B.; RÖMLING, U. Biofilm formation - what we can learn from recent developments. **J Intern Med**, v. 284, n. 4, p. 332-345, 2018.

BONGOMIN, F.; GAGO, S.; OLADELE, R.; DENNING, D.W. Global and multi-national prevalence of fungal diseases – estimate precision. **J. Fungi**, v. 3, n. 4, p. 57–62, 2017.

BONKAT, G.; BARTOLETTI, R.; BRUYERE, F.; CAI, T.; GEERLINGS, S.E.; KÖVES, B.; SCHUBERT, S.; WAGENLEHNER, F.; MEZEI, T.; PILATZ, A.; PRADERE, B. EAU guidelines on urological infections. **European Association of Urology**, v. 24, n. 18, p. 22-26, 2017.

BRILHANTE, R. S. N.; OLIVEIRA, J. S.; EVANGELISTA, A. J. J.; SERPA, R.; SILVA, A. CASTELO-BRANCO, D.S.; RIELLO, G.B.; VASCONCELOS, D.C.; GUEDES, G.M.; SERPA, R.; BANDEIRA, T.J.; MONTEIRO, A.J.; CORDEIRO, R.A.; ROCHA, M.F.; SIDRIM, J.J.; BRILHANTE, R.S. Farnesol increases the susceptibility of *Burkholderia pseudomallei* biofilm to antimicrobials used to treat melioidosis. **J Appl Microbiol**, v. 120, n. 3, p. 600-606, 2016.

BRILHANTE, R.S.N.; BITTENCOURT, P.V.; DE SOUZA COLLARES CASTELO-BRANCO, D.; DE MELO GUEDES, G.M.; DE OLIVEIRA, J.S.; ALENCAR, L.P.; AGUIAR CORDEIRO, R.; PINHEIRO, M.; NOGUEIRA-FILHO, E.F.; DE AQUINO PEREIRA-NETO, W.; SIDRIM, J.J.C.; ROCHA, M.F.G. Biofilms of *Candida* spp. from the ocular conjunctiva of horses with reduced azole susceptibility: a complicating factor for the treatment of keratomycosis? **Vet Ophthalmol**, v. 20, n. 6, p. 539-546, 2017.

BRILHANTE, R.S.N.; OLIVEIRA, J.S.; EVANGELISTA, A.J.J.; SERPA, R.; SILVA, A.L.D.; AGUIAR, F.R.M.; PEREIRA, V.S.; CASTELO-BRANCO, D.S.C.M.; PEREIRANETO, W.A.; CORDEIRO, R.A.; SIDRIM, J.J.C.; ROCHA, M.F.G. *Candida tropicalis* from veterinary and human sources shows similar in vitro hemolytic activity, antifungal biofilm susceptibility and pathogenesis against *Caenorhabditis elegans*. **Vet Microbiol**, v. 192, n. 1, p. 213-219, 2016.

CALDARA, M.; MARMIROLI, N. Antimicrobial properties of antidepressants and antipsychotics-possibilities and implications. **Pharmaceuticals**, v.14, n 1, p. 915, 2021.

CHAN, Y.Y.; ONG, Y.M.; CHUA, K.L. Synergistic interaction between phenothiazines and antimicrobial agents against *Burkholderia pseudomallei*. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 51, n. 2, p. 623-630, 2007.

CHELKEBA, L.; FANTA, K.; MULUGETA, T.; MELAKU, T. Bacterial profile and antimicrobial resistance patterns of common bacteria among pregnant women with bacteriuria in Ethiopia: a systematic review and meta-analysis. **Arch Gynecol Obstet**, v. 306, n. 3, p. 663-686, 2022.

CHENOWETH, C.E.; SAINT, S. Urinary tract infections. **Infect Dis Clin North Am**, v. 25, n 4, p. 103-115, 2011.

CHOI, M.J.; WON, E.J.; SHIN, J.H.; KIM, S.H.; LEE, W.G.; KIM, M.N.; LEE, K.; SHIN, M.G.; SUH, S.P.; RYANG, D.W.; IM, Y.J. Resistance mechanisms and clinical features of fluconazole-nonsusceptible *Candida tropicalis* isolates compared with fluconazole-less-susceptible isolates. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 60, n. 6, p. 3653-3661, 2016.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). Reference method CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. M-100 Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Standards M02-A12, M07-A10, and M11-A8; 27th ed. CLSI M100-S27. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA. 2017.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). Reference method. CLSI document M27- S4. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA. 2012.

COELHO, T.; MACHADO, D.; COUTO, I.; MASCHMANN, R.; RAMOS, D.; VON GROLL, A.; ROSSETTI, M.L.; SILVA, P.A.; VIVEIROS, M. Enhancement of antibiotic activity by efflux inhibitors against multidrug resistant *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates from Brazil. **Front Microbiol**, v. 6, p. 330, 2015.

COLLINS, T.J. ImageJ for microscopy. **BioTechniques**, v. 43, n. 1, p. 25–30, 2007.

CORDEIRO, R.A.; PORTELA, F.V.; PEREIRA, L.M.; ANDRADE, A.R.; SOUSA, J.K.; AGUIAR, A.L.; PERGENTINO, M.L.; SALES, G.S.; OLIVEIRA, J.S.; MEDRANO, D.J.; BRILHANTE, R.S.; ROCHA, M.F.; CASTELO-BRANCO, D.S.C.M.; SIDRIM, J.J. Efflux pump inhibition controls growth and enhances antifungal susceptibility of *Fusarium solani* species complex. **Future Microbiol**, v. 15, n. 1, p. 9-20, 2020.

COSTERTON, J.W.; GEESEY, G.G.; CHENG, K.J. How bacteria stick. **Sci Am**, v. 238, p. 86-95, 1978.

COSTERTON, J.W.; LEWANDOWSKI, Z.; CALDWELL, D.E.; KORBER, D.R.; LAPPIN-SCOTT, H.M. Microbial biofilms. **Annu Rev Microbiol**, v. 49, p. 711-45, 1995.

COUTINHO, H.D.; COSTA, J.G.; LIMA, E.O.; FALCÃO-SILVA, V.S.; SIQUEIRA JÚNIOR, J.P. Increasing of the aminoglycoside antibiotic activity against a multidrug resistant *E. coli* by *Turnera ulmifolia* L. and chlorpromazine. **Biol Res Nurs**, v. 11, n. 4, p. 332-325, 2010.

DASTIDAR, S.G.; KRISTIENSEN, J.E.; MOLNAR, J.; AMARAL, L. role of phenothiazines and structurally similar compounds of plant origin in the fight against infections by drug resistant bacteria. **Antibiotics**, v. 2, n. 1, p. 58-72, 2013.

DAUTT-LEYVA, J.G.; CANIZALEZ-ROMAN, A.; ACOSTA ALFARO, L.F.; GONZALEZ-IBARRA, F.; MURILLO-LLANES, J. Maternal and perinatal complications in pregnant women with urinary tract infection caused by *Escherichia coli*. **J Obstet Gynaecol Res**, v. 44, p. 1384-1390, 2018.

DIAS, V. *Candida* species in the urinary tract: is it a fungal infection or not? **Future Microbiol**, v. 15, n. 1, p. 81-83, 2020.

DUDECK, M.A.; HORAN, T.C.; PETERSON, K.D.; WEINER, L.M.; ALLEN-BRIDSON, K.; POLLOCK, D.A.; SIEVERT, D.M.; EDWARDS, J.R. National Healthcare Safety Network report, data summary for 2011, device-associated module. **Americ J Infect Control**. ed. 41, v. 4, p. 286-300, 2013.

DUDLEY, K.; LIU, X.; DE HAAN, S. Chlorpromazine dose for people with schizophrenia. **Cochrane Database Syst Rev**, v. 4, n. 4, 2017.

DUNNE, K.A.; CHAUDHURI, R.R.; ROSSITER, A.E.; BERIOTTO, I.; BROWNING, D.F.; SQUIRE, D.; CUNNINGHAM, A.F.; COLE, J.A.; LOMAN, N.; HENDERSON, I.R. Sequencing a piece of history: complete genome sequence of the original *Escherichia coli* strain. **Microb Genom**, v. 3, n. 3, 2017.

FAZELI, A.; KORDBACHEH, P.; NAZARI, A.; DAIE GHAZVINI, R.; MIRHENDI, H.; SAFARA, M.; BAKHSHI, H.; YAGHOUBI, R. Candiduria in hospitalized patients and identification of isolated *Candida* species by morphological and molecular methods in Ilam, Iran. **Iran J Public Health**, v. 48, n. 1, p. 156-161, 2019.

FIALLOS, N.M.; RIBEIRO AGUIAR, A.L.; DA SILVA, B.N.; PERGENTINO, M.L.M.; ROCHA, M.F.G.; SIDRIM, J.J.C.; MAIA, D.C.B.S.C.; CORDEIRO, R.A. The Potential of

phenothiazines against endodontic pathogens: a focus on *Enterococcus-Candida* dual-species biofilm. **Antibiotics (Basel)**, v. 11, n. 11, p. 1562, 2022.

FISHER, L.E.; HOOK, A.L.; ASHRAF, W.; YOUSEF, A.; BARRETT, D.A.; SCURR, D.J.; CHEN, X.; SMITH, E.F.; FAY, M.; PARMENTER, C.D. Biomaterial modification of urinary catheters with antimicrobials to give long-term broad spectrum antibiofilm activity. **J Control Release**, v. 202, p. 57-64, 2015.

FLORES-MIRELES, A.; HREHA, T.N.; HUNSTAD, D.A. Pathophysiology, treatment, and prevention of catheter-associated urinary tract infection. **Top Spinal Cord Inj Rehabil**, v. 25, n. 3, p. 228-240, 2019.

FLORES-MIRELES, A.L.; WALKER, J.N.; CAPARON, M.; HULTGREN, S.J. Urinary tract infections: epidemiology, mechanisms of infection and treatment options. **Nat rev Microbiol**, v. 13, n. 5, p. 269-284, 2015.

GAJDÁCS, M.; DÓCZI, I.; ÁBRÓK, M.; LÁZÁR, A.; BURIÁN, K. Epidemiology of candiduria and *Candida* urinary tract infections in inpatients and outpatients: results from a 10-year retrospective survey. **Cent. European J. Urol**, v. 72, n. 2, p. 209–214, 2019.

GALGÓCZY, L.; BÁCSI, A.; HOMA, M.; VIRÁGH, M.; PAPP, T.; VÁGVÖLGYI, C. In vitro antifungal activity of phenothiazines and their combination with amphotericin B against different *Candida* species. **Mycoses**, v. 54, n. 6, 2011.

GALGÓCZY, L.; PAPP, T.; KOVÁCS, L.; ORDÖGH, L.; VÁGVÖLGYI, C. In vitro activity of phenothiazines and their combinations with amphotericin B against Zygomycetes causing rhinocerebral zygomycosis. **Med Mycol**, v. 47, n. 3, p. 331-335, 2009.

GARCÍA, A.; FOX, J.G. A One Health perspective for defining and deciphering *Escherichia coli* pathogenic potential in multiple hosts. **Comp Med**, v. 71, n. 1, p. 3-45, 2021.

GARCIA RIVERA, M.V.; HEYL, J.J.; OH, M.C. *Candida auris* urinary tract infection in a nursing home patient with Multicomorbidities. **Cureu**, v. 12, n. 12, 2020.

GHOLAMI, M.; HASHEMI, A.; HAKEMI-VALA, M.; GOUDARZI, H.; HALLAJZADEH, M. Efflux pump inhibitor Phenylalanine-Arginine B-Naphthylamide effect on the minimum inhibitory concentration of imipenem in *Acinetobacter baumannii* Strains isolated from hospitalized patients in shahid motahari burn hospital, Tehran, Iran. **Jundishapur J Microbiol**, v. 8, n. 10, 2015.

GRIMSEY, E.M.; FAIS, C.; MARSHALL, R.L.; RICCI, V.; CIUSA, M.L.; STONE, J.W.; IVENS, A.; MALLOCI, G.; RUGGERONE, P.; VARGIU, A.V.; PIDDOCK, L.J.V. Chlorpromazine and amitriptyline are substrates and inhibitors of the acrb multidrug efflux pump. **mBio**, v. 11, n. 3, 2020.

GRIMSEY, E.M.; PIDDOCK, L.J.V. Do phenothiazines possess antimicrobial and efflux inhibitory properties? **FEMS Microbiol Rev**, v. 43, n. 6, p. 577-590, 2019.

GUERRA, M.E.S.; DESTRO, G.; VIEIRA, B.; LIMA, A.S.; FERRAZ, L.F.C.; HAKANSSON, A.P.; DARRIEUX, M.; CONVERSO, T.R. *Klebsiella pneumoniae* biofilms and their role in disease pathogenesis. **Front Cell Infect Microbiol**, v. 12, 2022.

GUTIERREZ-CUADRA, M.; HORCAJADA, J.; MARTINEZ, I. 111-Indium labelled leukocyte renal scintigraphy in patients with candiduria: Preliminary results of a prospective study. **Int. J. Antimicrob. Agents**, v. 29 n. 1, p. 261, 2007.

HØIBY, N. A personal history of research on microbial biofilms and biofilm infections. **Pathog Dis**, v. 70, n. 3, p.205-211, 2014.

HOOTON, T.M. Nosocomial Urinary Tract Infections. In: MANDELL, G.L.; BENNETT, J.E.; DOLIN, R. editors. Mandell, Douglas and Bennett's principles and practice of infectious diseases, Philadelphia: **Elsevier**. ed. 7, v. 2, p. 3725-3737, 2010.

HSIAO, C.; YANG, H.; CHANG, C.; LIN, H.; WU, C.; HSIAO, M. Risk Factors for Development of Septic Shock in Patients with Urinary Tract Infection. **BioMed Res Internat**, v. 15, p. 1-7, 2015.

HSUEH, P.R.; HOBAN, D.J.; CARMELI, Y.; CHEN, S.Y.; DESIKAN, S.; ALEJANDRIA, M.; KO, W.C.; BINH, T.Q. Consensus review of the epidemiology and appropriate antimicrobial therapy of complicated urinary tract infections in Asia-Pacific region. **J Infect**, v. 63, n. 2, p. 114-123, 2011.

JACOBSEN, S.M.; SHIRTLIFF, M.E. *Proteus Mirabilis* biofilms and catheter-associated urinary tract infections. **Virulence**, v. 2, n. 5, p. 460–465, 2011.

JESUS, J.S.; COELHO, M.F.; LUZ, R.A. Cuidados de enfermagem para prevenção de infecção do trato urinário em pacientes com cateterismo vesical de demora (CVD) no ambiente hospitalar. **Arq Med Hosp Fac Cienc Med Santa Casa São Paulo**, v. 63, n. 2, p. 96-99, 2018.

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

KAUFFMAN, C.A. Diagnosis and management of fungal urinary tract infection. **Infect. Dis. Clin. N. Am**, v. 28, n. 1, p. 61–74, 2014.

KRISTIANSEN, M.M.C.; LEANDRO, D.; ORDWAY, M.; MARTINS, M.; VIVEIROS, T.; PACHECO, J.; MOLNAR, J.E.; KRISTIANSEN, AMARAL, L. Thioridazine reduces resistance of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by inhibiting a reserpine-sensitive efflux pump. **In Vivo**, v. 20, n. 1, p. 361-366, 2006.

KLINE, K.A.; LEWIS, A.L. Gram-Positive Uropathogens, Polymicrobial Urinary Tract Infection, and the Emerging Microbiota of the Urinary Tract. **Microbiol spect**, v. 4, n. 2, p. 10-1128, abr. 2016.

KONEMAN, E. W.; WINN, W.C.; ALLEN, S.D.; JANDA, W.M.; PROCOP, G.W.; SCHRECKENBERGER, P. C.; WOODS, G.J. Diagnóstico Microbiológico: texto e atlas colorido, 12 Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2012, p. 403-412.

KUMAR, P.; NAGARAJAN, A.; UCHIL, P.D. Analysis of Cell Viability by the MTT Assay. Cold Spring Harb Protoc. 2018. doi: 10.1101/pdb.prot095505. PMID: 29858338

LA BELLA, A.A.; ANDERSEN, M.J.; GERVAIS, N.C.; MOLINA, J.J.; MOLESAN, A.; STUCKEY, P.V.; WENSING, L.; NOBILE, C.J.; SHAPIRO, R.S.; SANTIAGO-TIRADO, F.H.; FLORES-MIRELES, A.L. The catheterized bladder environment promotes Efg1- and Als1-dependent *Candida albicans* infection. **Sci Adv**, v. 9, n. 9, 2023.

LAGADINOU, M.; ONISOR, M.O.; RIGAS, A.; MUSETESCU, D.V.; GKENTZI, D.; ASSIMAKOPOULOS, S.F.; PANOS, G.; MARANGOS, M. Antimicrobial properties on non-antibiotic drugs in the era of increased bacterial resistance. **Antibiotics (Basel)**, v. 9, n. 3, p. 107, 2020.

LEATHAM, M.P.; BANERJEE, S.; AUTIERI, S.M.; MERCADO-LUBO, R.; CONWAY, T.; COHEN, P.S. Precolonized human commensal *Escherichia coli* strains serve as a barrier to *E. coli* O157:H7 growth in the streptomycin-treated mouse intestine. **Infect Immun**, v. 77, p. 2876–2886, 2009.

LI, X.Z.; BARRÉ, N.; POOLE, K. Influence of the MexA-MexB-oprM multidrug efflux system on expression of the MexC-MexD-oprJ and MexE-MexF-oprN multidrug efflux systems in *Pseudomonas aeruginosa*. **J. Antimicrob. Chemother**, v. 46, n. 1, p. 885–893 2000.

LI, X.Z.; NIKAIDO, H. Efflux-mediated drug resistance in bacteria. **Drugs**, v. 64, n. 2, p. 159-204, 2004.

LI, X.Z.; PLÉSIAT, P.; NIKAIDO, H. The challenge of efflux-mediated antibiotic resistance in Gram-negative bacteria. **Clin Microbiol Rev**, v. 28, n. 2, p. 337-418, 2015.

LOGAN, L.K.; WEINSTEIN, R.A. The epidemiology of carbapenem-resistant enterobacteriaceae: the impact and evolution of a global menace. **J Infect Dis**, v. 215, n. 1, p. S28-S36, 2017.

LORENTE, L. Antimicrobial-impregnated catheters for the prevention of catheter-related bloodstream infections. **World J Crit Care Med**, v. 5, n. 2, p. 137-142.

LU, X.; WANG, G.; XIE, Y.; TANG, W.; LIU, B.; ZHANG, J. Efflux pump inhibitor combined with ofloxacin decreases MRSA biofilm formation by regulating the gene expression of NorA and quorum sensing. **RSC Adv**, v. 13, n. 4, p. 2707-2717, 2023.

MAGLIANO, E.; GRAZIOLI, V.; DEFLORIO, L.; LEUCI, A.I.; MATTINA, R.; ROMANO, P.; COCUZZA, C.E. Gender and age-dependent etiology of community-acquired urinary tract infections. **ScientificWorldJournal**, V. 2012, 2012.

MANSOURI, F.; SHEIBANI, H.; MASROOR, M.J.; AFSHARIAN, M. Extended-spectrum beta-lactamase (ESBL)-producing Enterobacteriaceae and urinary tract infections in pregnant/postpartum women: a systematic review and meta-analysis. **Int J Clin Pract**, v. 73, n. 12, 2019.

MASSON, P.; MATHESON, S.; WEBSTER, A.C.; CRAIGER, J.C. Metaanalyses in prevention and treatment of urinary tract infections. **Infect Dis Clin North America**, v. 23, p. 355-385, 2009.

MAZA, P.K.; BONFIM-MELO, A.; PADOVAN, A.C.B.; MORTARA, R.A.; ORIKAZA, C.M.; RAMOS, L.M.D.; MOURA, T.R.; SORIANI, F.M.; ALMEIDA, R.S.; SUZUKI, E. *Candida albicans*: The ability to invade epithelial cells and survive under oxidative stress is unlinked to hyphal length. **Front. Microbiol**, v. 8, n. 1, 2017.

MEŠTROVIĆ, T.; MATIJAŠIĆ, M.; PERIĆ, M.; ČIPČIĆ PALJETAK, H.; BAREŠIĆ, A.; VERBANAC, D. The role of gut, vaginal, and urinary microbiome in urinary tract infections: from bench to bedside. **Diagnostics (Basel)**, v. 11, n. 1, p. 7, 2020.
Microbiology, v. 192, p. 213-219, 2016.

MITTAL, R.; AGGARWAL, S.; SHARMA, S.; CHHIBBER, S.; HARJAI, K. Urinary tract infections caused by *Pseudomonas aeruginosa*: a minireview. **J Infect Public Health**, v. 2, n. 3, p. 101-111, 2009.

MORITA, Y.; MURATA, T.; MIMA, T.; SHIOTA, S.; KURODA, T.; MIZUSHIMA, T.; GOTOH, N.; NISHINO, T.; TSUCHIYA, T. Induction of mexCD-oprJ operon for a multidrug efflux pump by disinfectants in wild-type *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. **J Antimicrob Chemother**, v. 51, n. 4, p. 991-994, 2003.

NAVARRO, S.; SHERMAN, E.; COLMER-HAMOOD, J.A.; NELIUS, T.; MYNTTI, M.; HAMOOD, A.N. Urinary catheters coated with a novel biofilm preventative agent inhibit biofilm development by diverse bacterial uropathogens. **Antibiotics (Basel)**, v. 11, n. 11, p. 1514, 2022.

NEHME, H.; SAULNIER, P.; RAMADAN, A.A.; CASSISA, V.; GUILLET, C.; EVEILLARD, M.; UMERSKA, A. Antibacterial activity of antipsychotic agents, their association with lipid nanocapsules and its impact on the properties of the nanocarriers and on antibacterial activity. **PLoS One**, v. 13, n. 1, 2018.

NESSE, L.L.; OSLAND, A.M.; VESTBY, L.K. The role of biofilms in the pathogenesis of animal bacterial infections. **Microorganisms**, v. 11, n. 3, p. 608, 2023.

NEWMAN, D.K.; WYMAN, J.F.; WELCH, V.W. Core Curriculum for Urologic Nursing. **Jannetti Publications**; Pitman, NJ, USA, 1ed, 2016.

NIEMIEC, M.J.; KAPITAN, M.; HIMMEL, M.; DÖLL, K.; KRÜGER, T.; KÖLLNER, T.G.; AUGÉ, I.; KAGE, F.; ALTERI, C.J.; MOBLEY, H.L.T.; MONSEN, T.; LINDE, S.; NIETZSCHE, S.; KNIEMEYER, O.; BRAKHAGE, A.A.; JACOBSEN, I.D. Augmented enterocyte damage during *Candida albicans* and *Proteus mirabilis* coinfection. **Front Cell Infect Microbiol**, v. 12, n. 1, 2022.

NIKAIDO, H.; TAKATSUKA, Y. Mechanisms of RND multidrug efflux pumps. **Biochim Biophys Acta**, v. 1794, n. 5, p. 769-781, 2009.

NIVEDITHA, S.; PRAMODHINI, S.; UMADEVI, S.; KUMAR, S.; STEPHEN, S. The isolation and the biofilm formation of uropathogens in the patients with catheter associated urinary tract infections (UTIs). **J Clin Diagn Res**, v. 6, n. 9, p. 1478–1482, 2012.

NOBILE, C.J.; JOHNSON, A.D. *Candida albicans* biofilms and human disease. **Annu Rev Microbiol**, v. 69, n. 1, p. 71-92, 2015.

OKULICZ, J.F.; RIVARD, R.G.; CONGER, N.G.; NGUYEN, M.X.; HOSPENTHAL, D.R. Primary isolation of *Candida* species from urine specimens using chromogenic medium. **Mycoses**, v. 51, n. 1, p. 141–146, 2008.

PAPPAS, P.G.; KAUFFMAN, C.A.; ANDES, D.R.; CLANCY, C.J.; MARR, K.A.; OSTROSKY-ZEICHNER, L.; REBOLI, A.C.; SCHUSTER, M.G.; VAZQUEZ, J.A.; WALSH, T.J.; ZAOUTIS, T.E.; SOBEL, J.D. Executive summary: Clinical practice guideline for the management of candidiasis: 2016 update by the infectious diseases society of America. **Clin Infect Dis**, v. 62, n. 4, p. 409-417, 2016.

PLATT, R.; POLK, B.F.; MURDOCK, B.; ROSNER, B. Mortality associated with nosocomial urinary-tract infection. **N Engl J Med**, v. 307, n. 11, p. 637-642, 1982.

PODSCHUN, R.; PIETSCH, S.; HÖLLER, C.; ULLMANN, U. Incidence of *Klebsiella* species in surface waters and their expression of virulence factors. **Appl Environ Microbiol**, v. 67, n. 7, p. 3325-3327, 2001.

POLONI, J.A.T.; ROTTA, L.N. Urine sediment findings and the immune response to pathologies in fungal urinary tract infections caused by *Candida* spp. **J Fungi (Basel)**, v. 6, n. 4, p. 245, 2020.

PONDE, N.O.; LORTAL, L.; RAMAGE, G.; NAGLIK, J.R.; RICHARDSON, J.P. *Candida albicans* biofilms and polymicrobial interactions. **Crit Rev Microbiol**, v. 47, n. 1, p. 91-111, 2021.

RAJAKARUNA, G. Urinary tract infection. In: HarberM(ed) Practical nephrology. **Springer London**, p. 395-411, 2014.

ROJAS-LOPEZ, M.; MONTERIO, R.; PIZZA, M.; DESVAUX, M.; ROSINI, R. Intestinal Pathogenic *Escherichia coli*: Insights for Vaccine Development. **Front Microbiol**, v. 9, p. 440, 2018.

ROSHNIAMALARADJOU, M.A.; VENKITANARAYANAN, K. Role of Bacterial Biofilms in Catheter-Associated Urinary Tract Infections (CAUTI) and Strategies for Their Control. **INTECH**, p. 2-14, jul, 2013. Disponível em: <https://www.intechopen.com/books/recent-advances-in-the-field-of-urinary-tract-infections/role-of-bacterial-biofilms-in-catheter-associated-urinary-tract-infections-cauti-and-strategies-for->. Acesso em: 07 jun, 2023.

RYDER, C.; BYRD, M.; WOZNAK, D.J. Role of polysaccharides in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. **Curr Opin Microbiol**, v. 10, n. 6, p. 644-648, 2007.

SAINI, H.; CHHIBBER, S.; HARJAI, K. Antimicrobial and antifouling efficacy of urinary catheters impregnated with a combination of macrolide and fluoroquinolone antibiotics against *Pseudomonas aeruginosa*. **Biofouling**, v. 32, n. 1, p. 511-522, 2016.

SAINT, S.; CHENOWETH, C.E. Biofilms and catheter-associated urinary tract infections. **Infect Dis Clin North Am**, v. 17, n. 2, p. 411-432, 2003.

SHIGEMURA, K.; OSAWA, K.; KATO, A.; TOKIMATSU, I.; ARAKAWA, S.; SHIRAKAWA, T.; FUJISAWA, M. Association of overexpression of efflux pump genes with antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* strains clinically isolated from urinary tract infection patients. **J Antibiot (Tokyo)**, v. 68, n. 9, p. 568-572, 2015.

SHAH, C.; BARAL, R.; BARTAULA, B.; SHRESTHA, L.B. Virulence factors of uropathogenic *Escherichia coli* (UPEC) and correlation with antimicrobial resistance. **BMC Microbiol**, v. 19, n. 1, p.204, 2019.

SHARMA, S.; KAUR, H.; KHULLER, G.K. Cell cycle effects of the phenothiazines: trifluoperazine and chlorpromazine in *Candida albicans*. **FEMS Microbiol Lett**, v. 199, n. 2, p. 185-190, 2001.

SIDRIM, J.J.; AMANDO, B.R.; GOMES, F.I.; DO AMARAL, M.S.; DE SOUSA, P.C.; OCADAQUE, C.J.; BRILHANTE, R.S.; CORDEIRO, R.A.; ROCHA, M.F.; CASTELO-BRANCO, D.S.C.M. Chlorpromazine-impregnated catheters as a potential strategy to control biofilm-associated urinary tract infections. **Future Microbiol**, v. 14, n.1, p. 1023-1034, 2019.

SIDRIM, J.J.C.; VASCONCELOS, D.C.; RIELLO, G.B.; GUEDES, G.M.M.; SERPA, R.; BANDEIRA, T.J.P.G.; MONTEIRO, A.J.; CORDEIRO, R.A.; CASTELO-BRANCO, D.S.C.M.; ROCHA, M.F.G.; BRILHANTE, R.S.N. Promethazine improves antibiotic efficacy and disrupts biofilms of *Burkholderia pseudomallei*. **Biofoul (New York. Print)**, v. 33, p. 88-97, 2017.

SOBEL, J.D.; Vaginitis. **N Engl J Med**, v. 337, n. 26, p. 1896-1903, 1997.

SOLANO, C.; ECHEVERZ, M.; LASA, I. Biofilm dispersion and quorum sensing. **Curr. Opin. Microbiol**, v. 18, n. 1, p. 96-104, 2014.

STEPANOVIC, S.; IRKOVIC, I.C.; RANIN, L.; SVABIC'-VLAHOVIC, M. Biofilm formation by *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes* on plastic surface. **Lett Appl Microbiol**, v. 38, p. 428-432, 2004.

STEPANOVIĆ, S.; VUKOVIĆ, D.; HOLA, V.; DI BONAVENTURA, G.; DJUKIĆ, S.; CIRKOVIĆ, I.; RUZICKA, F. Quantification of biofilm in microtiter plates: overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by *Staphylococci*. **APMIS**, v. 115, n. 8, p. 891-899, 2007.

STRICKLAND, A.B.; SHI, M. Mechanisms of fungal dissemination. **Cell Mol Life Sci**, v. 78, n. 7, p. 3219-3238, 2021.

TALAPKO, J.; JUZBAŠIĆ, M.; MATIJEVIĆ, T.; PUSTIJANAC, E.; BEKIĆ, S.; KOTRIS, I.; ŠKRLEC, I. *Candida albicans* - The virulence factors and clinical manifestations of infection. **J Fungi (Basel)**, v. 7, n. 2, p. 79, 2021.

TAMADONFAR, K.O.; OMATTAGE, N.S.; SPAULDING, C.N.; HULTGREN, S.J. Reaching the end of the line: Urinary tract infections. **Microbiol Spectr**, v. 7, n. 3, 2019.
TORZEWSKA, A.; RÓŻALSKI, A. Various intensity of *Proteus mirabilis*-induced crystallization resulting from the changes in the mineral composition of urine. **Acta Biochim Pol**, v. 62, n. 1, p. 127-132, 2015.

TENKE, P.; KOVACS, B.; BJERKLUND JOHANSEN, T.E.; MATSUMOTO T, TAMBYAH, P.A.; NABER, K.G. European and Asian guidelines on management and prevention of catheter-associated urinary tract infections. **Int J Antimicrob Agents**, n. 1, p. S68-78, 2008.

TRAN, P.L.; HAMOOD, A.N.; REID, T.W. Antimicrobial coatings to prevent biofilm formation on medical devices. In: RUMBAUGH, K.P.; AHMAD, I. editors. *Antibiofilm Agents*. Volume 8. **Springer**; Berlin/Heidelberg, Germany, p. 175–204, 2014.

TRAUTNER, B.W.; DAROUICHE, R.O. Role of biofilm in catheter-associated urinary tract infection. **Am. J. Infect. Control**, v. 32, n. 1, p. 177–183, 2004.

TUON, F.F.; DANTAS, L.R.; SUSS, P.H.; TASCA RIBEIRO, V.S. Pathogenesis of the *Pseudomonas Aeruginosa* biofilm: a review. **Pathogens**, v. 11, n. 1, p. 300, 2022.

URUEN, C.; CHOPO-ESCUIN, G.; TOMMASSEN, J.; MAINAR-JAIME, R.C.; ARENAS, J. Biofilms as promoters of bacterial antibiotic resistance and tolerance. **Antibiotics**, v. 10, n. p. 3, 2020.

VESTBY, L.K.; GRØNSETH, T.; SIMM, R.; NESSE, L.L. Bacterial biofilm and its role in the pathogenesis of disease. **Antibiotics (Basel)**, v. 9, n. 2, p. 59, 2020.

VIKRAM, A.; BOMBERGER, J.M.; BIBBY, K.J. Efflux as a glutaraldehyde resistance mechanism in *Pseudomonas fluorescens* and *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 59, n. 6, p. 3433-3440, 2015.

WANG, Y.; VENTER, H.; MA, S. Efflux pump inhibitors: a novel approach to combat efflux-mediated drug resistance in bacteria. **Curr Drug Targets**, v. 17, n. 6, p. 702-719, 2016.

WERNEBURG, G.T. Catheter-associated urinary tract infections: current challenges and future prospects. **Res Rep Urol**, v. 14, p. 109-133, 2022.

WI, Y.M.; PATEL, R. Understanding biofilms and novel approaches to the diagnosis, prevention, and treatment of medical device-associated infections. **Infect Dis Clin North Am**, v. 32, n. 4, p. 915-929, 2018.

WOOD, N.C.; NUGENT, K.M. Inhibitory effects of chlorpromazine on *Candida* species. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 27, n. 5, p. 692-694, 1985.

WYRES, K.L.; WICK, R.R.; GORRIE, C.; JENNEY, A.; FOLLADOR, R.; THOMSON, N.R.; HOLT, K.E. Identification of *Klebsiella* capsule synthesis loci from whole genome data. **Microb Genom**, v. 2, n. 12, 2016.

ZGURSKAYA, H.I.; WALKER, J.K.; PARKS, J.M.; RYBENKOV, V.V. Multidrug efflux pumps and the two-faced janus of substrates and inhibitors. **Acc Chem Res**, v. 54, n. 4, p. 930-939, 2021.

ZILBERSTEIN, D.; LIVEANU, V.; GEPSTEIN, A. Tricyclic drugs reduce proton motive force in *Leishmania donovani* promastigotes. **Biochem Pharmacol**, v. 39, n. 5, p. 935-940, 1990.