



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

**PAULO ROBERTO HONÓRIO DE SOUZA**

**EFEITO DO HALOPERIDOL SOBRE O BIOFILME E SENSIBILIDADE  
ANTIMICROBIANA DE BACIOS GRAM NEGATIVOS DE INFECÇÕES  
RELACIONADAS À SAÚDE**

**FORTALEZA-CE**

**2023**

PAULO ROBERTO HONÓRIO SOUZA

**EFEITO DO HALOPERIDOL SOBRE O BIOFILME E SENSIBILIDADE  
ANTIMICROBIANA DE BACIOS GRAM NEGATIVOS DE INFECÇÕES  
RELACIONADAS À SAÚDE**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Médica da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Microbiologia Médica. Área de concentração: Microbiologia Humana e Animal.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Gláucia Morgana de Melo Guedes.

Coorientadora: Profa. Dra. Débora Castelo Branco de Souza Collares Maia

FORTALEZA-CE

2023

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)

---

S234e Souza, Paulo Roberto Honório de.  
Efeito do haloperidol sobre o biofilme e sensibilidade antimicrobiana de bacilos Gram negativos de infecções relacionadas à saúde/ Paulo Roberto Honório de Souza. – 2023.  
58 f. : il. color.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Programa de PósGraduação em Microbiologia Médica, Fortaleza, 2023.  
Orientação: Profa. Dra. Gláucia Morgana de Melo Guedes.  
Coorientação: Profa. Dra. Débora Castelo Branco de Souza Collares Maia.

1. Biofilme. 2. Haloperidol. 3. IRAS. 4. Resistência antimicrobiana. I. Título.

CDD 616.9

---

PAULO ROBERTO HONÓRIO SOUZA

EFEITO DO HALOPERIDOL SOBRE O BIOFILME E SENSIBILIDADE  
ANTIMICROBIANA DE BACILOS GRAM NEGATIVOS DE INFECÇÕES  
RELACIONADAS À SAÚDE

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Médica da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Microbiologia Médica. Área de concentração: Microbiologia Humana e Animal.

Aprovada em: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_\_\_.

BANCA EXAMINADORA

---

Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Gláucia Morgana de Melo Guedes (Orientadora)  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Giovanna Riello Barbosa Correia  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

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

A Deus.

A minha avó, tia, tio e mãe.

A minha irmã e meus primos.

Aos meus amigos.

Vocês estão sempre comigo.

## AGRADECIMENTOS

A Deus.

À CAPES, pelo apoio financeiro com a manutenção da bolsa de auxílio.

À Profa. Dra. Glaucia Morgana de Melo Guedes, por todos seus ensinamentos, principalmente com os cálculos dos fármacos, e as experiências que me permitiu vivenciar ao longo do mestrado, sua compreensão e cuidado ficará sempre marcado nas experiências da minha vida, como profissional e ser humano. Tenho na senhora uma enorme inspiração, muito obrigado!

À Profa. Dra. Débora Castelo Branco de Souza Collares Maia, pelo acolhimento, por toda ajuda e companheirismo no dia a dia do laboratório, desde a ajuda com documentos e dúvidas burocráticas até as simples conversas rotineiras que tornavam os dias de trabalho no laboratório mais leves.

Aos professores participantes da banca de qualificação e defesa, Dra. Giovanna Riello Barbosa Correia Dra. Silviane Praciano Bandeira e Saulo Relison Tintino, pela disponibilidade no aceite desse convite e auxílio na melhoria deste trabalho. Obrigado pelas valiosas colaborações e sugestões.

A todos os funcionários do setor da Microbiologia do Hospital Universitário Walter Cantídio (HUWC), em especial ao microbiologista Paulo César e aos técnicos André e Mariana, por todo apoio na obtenção e identificação das cepas do estudo. Sem vocês essa pesquisa não seria possível.

À minha avó, dona Francisca, por ser a mãe atenciosa, cuidadosa e amorosa que sempre é, que mesmo estando longe continua pensando e zelando por mim, amo muito a senhora. A minha tia, Vlaney, por me oferecer o alicerce e apoiar sempre meus estudos junto a minha avó, que nunca desistiram de mim mesmo nos meus momentos mais chatos e aborrecentes e sempre ser a pessoa que se preocupa com todos, você é uma pessoa especial na minha vida.

À minha mãe, Aurenícia, que mesmo de longe sempre mantém contato, se preocupa comigo e procura saber como estou e me apoia nas minhas decisões e ambições.

À minha irmã Rainara e meus primos Leonardo e Pedro, sempre lembro de vocês com carinho, zelo e amor, apesar de eu não ser uma pessoa muito comunicativa.

Ao meu melhor amigo Vinicius por sempre ouvir o que eu tenho para falar mesmo as vezes sendo só reclamações e por estar comigo em momentos difíceis. À Alyne que junto do Vinicius me ajudaram em todos os momentos da minha pesquisa, desde os experimentos

até a finalização da dissertação, vocês realmente foram luz e estiveram ao meu lado, obrigado pelo companheirismo. A vocês minha eterna gratidão e admiração.

A todos os amigos e colegas que tive a honra de trabalhar e conhecer durante o mestrado no Programa de Microbiologia Médica em especial as pessoas do Laboratório de Bacteriologia, Thiago, Lucia, Carliane, Rodrigo, Jaiane, Luana, Expedito, Juliana, Ana Carla, Bruno, Ivan, Vicente, Felipe, Marcos, Jardel, Leones, Marcos Vinicius, Gabriel, Kézia e Ingrid que fizeram parte de momentos tanto felizes como tristes que eu vou sempre lembrar com todo carinho, vocês tornaram minha experiência do mestrado mais colorida.

Aos meus amigos de apartamento Ivan e Lara que convivem comigo e dividiram momentos especiais de alegria e dificuldades durante esses dois anos intensos.

À minha amiga Lara que lembra de mim com um cuidado muito especial.

A minha amiga de infância Alexia, mesmo com todas as mudanças nas nossas vidas sempre mantivemos a amizade e lembramos um do outro, obrigado por continuar valorizando os momentos que vivemos.

Por fim, e não menos importante, a todos os funcionários do prédio da Biomedicina, pela manutenção e cuidado com nosso ambiente de trabalho, em especial, ao Seu João, Valdemir, Rogério, Marcílio e Waliton.

“Levante-se e tenha orgulho, não importa o quão fraco ou indigno você se sinta, incendeie o seu coração, cerre os dentes e siga em frente.”

*Koyoharu Gotōge*

## RESUMO

As infecções relacionadas à assistência à saúde causadas por Gram-negativos têm se tornado uma problemática crescente com o aumento da resistência aos antimicrobianos principalmente mediada pela produção do biofilme, por esse motivo se faz necessário a busca por novos compostos e fármacos que possam ajudar no tratamento contra essas infecções. Assim, o presente estudo avaliou o efeito do antipsicótico haloperidol na sensibilidade antibacteriana e antibiofilme em *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii* e *Klebsiella pneumoniae*. Os testes de sensibilidade planctônica ao haloperidol isolado e em combinação com antimicrobianos foi feito pelo método de microdiluição em caldo para determinação da (CIM). O efeito antibiofilme foi avaliado por meio da quantificação da biomassa do biofilme, corada com cristal violeta, e da atividade metabólica, com uso da resazurina, para determinação da concentração eliminatória mínima do biofilme (CEMB). Ademais, foi avaliada a estrutura do biofilme após a exposição ao haloperidol, por microscopia confocal. Os intervalos de concentração inibitória mínima (CIM) do haloperidol foi de 512, 64 a 128 e 128 µg /mL para *P. aeruginosa*, *A. baumannii* e *K. pneumoniae* respectivamente. Em combinação, houve uma redução CIMs do antimicrobianos na combinação de haloperidol CIM/2 com amicacina. Em relação ao biofilme, o haloperidol causou desestruturação da biomassa em todas as espécies, nas concentrações de 512, 256 e 128 µg /mL as reduções foram de 73%, 77% e 77% em *P. aeruginosa*, 78%, 76% e 65% em *A. baumannii* e de 85%, 66% e 51% em *K. pneumoniae* respectivamente. As CEMBs do antimicrobianos depois de associar o (CEMB/2) reduziram com significância estatística frente a *P. aeruginosa*, e a CEMB do meropenem foi reduzida em todas as espécies. Em suma, o haloperidol inibe o crescimento bacterianos além de dispersar e desestruturar o biofilme podendo potencializar o efeito dos antimicrobianos.

**Palavras-chave:** Biofilme, Haloperidol, IRAS, Resistência antimicrobiana.

## ABSTRACT

Healthcare-related infections caused by Gram-negative bacteria have become a growing problem with the increase of antimicrobial resistance, mainly mediated by biofilm production. For this reason, it is necessary to search for new compounds and drugs that can help in the treatment against these infections. Thus, the present study evaluated the effect of the antipsychotic haloperidol on antimicrobial and antibiofilm sensitivity in *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii* and *Klebsiella pneumoniae*. Planktonic sensitivity testing to haloperidol alone and in combination with antimicrobials was done by the broth microdilution method to determine the (MIC). The antibiofilm effect was evaluated by quantification of biofilm biomass, stained with crystal violet, and metabolic activity, using resazurin, to determine the minimal biofilm elimination concentration (MBEC). Furthermore, the structure of the biofilm after exposure to haloperidol was evaluated by confocal microscopy. The minimum inhibitory concentration (MIC) ranges of haloperidol were 512, 64 to 128 and 128 µg /mL for *P. aeruginosa*, *A. baumannii* and *K. pneumoniae* respectively. In combination, there was a reduction MICs of the antimicrobials in the combination of haloperidol MIC/2 with amikacin. In relation to biofilm, haloperidol caused destructuring of the biomass in all species, in concentrations of 512, 256 and 128 µg /mL the reductions were 73%, 77% and 77% in *P. aeruginosa*, 78%, 76% and 65% in *A. baumannii* and 85%, 66% and 51% in *K. pneumoniae* respectively. The MBECs of the antimicrobials after associating (MBEC/2) were reduced with statistical significance against *P. aeruginosa*, and the MBEC of meropenem was reduced in all species. In summary, haloperidol inhibits bacterial growth besides dispersing and destructuring the biofilm, and may potentiate the effect of antimicrobials.

**Keywords:** Biofilm, Haloperidol, Healthcare-related infections, Antibiotic resistance.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Esquema da formação de biofilme bacteriano.....	21
Figura 2 – Prevalência de microrganismos causadores de Infecções Primárias de Corrente Sanguínea Laboratorial (IPCSL) em UTIs pediátricas.....	24
Figura 3 – Estrutura química do haloperidol.....	28
Figura 4 – Efeitos do haloperidol em biofilmes maduros de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (n=6), <i>Acinetobacter baumannii</i> (n=6) e <i>Klebsiella pneumoniae</i> (n=6).....	42
Figura 5 – Imagens representativas de microscopia confocal de varredura a laser dos biofilmes maduros de <i>P. aeruginosa</i> , <i>A. baumannii</i> e <i>K. pneumoniae</i> após exposição ao haloperidol.....	43
Figura 6 – Análise tridimensional de imagens Z-stack adquiridas por microscopia de varrimento a laser confocal de biofilmes maduros de <i>P. aeruginosa</i> , <i>A. baumannii</i> e <i>K. pneumoniae</i> após exposição ao haloperidol.....	44

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1 – Concentração inibitória mínima (CIM) de haloperidol, ciprofloxacina (CIP), meropenem (MER) e amicacina (AMK) isolado e em associação contra *Pseudomonas aeruginosa* (n=6), *Acinetobacter baumannii* (n=6) e *Klebsiella pneumoniae* (n=6)..... 39
- Tabela 2 – Concentrações eliminatórias mínimas do biofilme (CEMBs) para haloperidol, ciprofloxacina (CIP), meropenem (MER) e amicacina (AMK) isolado e associado contra *Pseudomonas aeruginosa* (n=6), *Acinetobacter baumannii* (n=6) e *Klebsiella pneumoniae* (n=6)..... 41

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AMK	Amicacina
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
BGNMF	Bacilo Gram-negativo não fermentador
BHE	Barreira hematoencefálica
BHI	<i>Brain Heart Infusion</i>
BrCAST	<i>Brazilian Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing</i>
CDC	Centro de Controle e Prevenção de Doenças
CEMB	Concentração Eliminatória Mínima sobre o Biofilme
CFU	Unidade formadora de colônia
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CIP	Ciprofloxacina
CLSI	<i>Clinical &amp; Laboratory Standards Institute</i>
DO	Densidade óptica
ESBL	$\beta$ -Lactamases de Espectro Estendido
ESKAPEE	<i>Enterococcus faecium, Staphylococcus aureus, Klebsiella pneumoniae, Acinetobacter baumannii, Pseudomonas aeruginosa, Enterobacter spp. e Escherichia coli</i>
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
GrAMM	Grupo Aplicado em Microbiologia Médica
IPCSL	Infecções primárias de corrente sanguínea laboratorial
IRAS	Infecções relacionadas à assistência à saúde
KPC	<i>Klebsiella pneumoniae</i> Carbapenemase
LPS	Lipopolisacarídeo
MDR	Multidroga resistente
MER	Meropenem
OMS	Organização Mundial de Saúde
OXA-23	Oxacilinase-23
PBS	Phosphate buffered saline
RAM	Resistência antimicrobiana
RND	Divisão de nodulação de resistência
UFC	Universidade Federal do Ceará

UTI

Unidade de terapia intensiva

## SUMÁRIO

1	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	17
2	<b>REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	19
2.1	<b>Resistência bacteriana</b> .....	19
2.2	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> e seus mecanismos de resistência.....	22
2.3	<i>Acinetobacter baumannii</i> e seus mecanismos de resistência.....	23
2.4	<i>Klebsiella pneumoniae</i> e seus mecanismos de resistência.....	25
2.5	<b>Reposicionamento de fármacos</b> .....	26
2.5.1	<i>Fármacos psicotrópicos</i> .....	27
2.5.1.1	<i>Haloperidol</i> .....	28
3	<b>HIPÓTESES</b> .....	31
4	<b>OBJETIVOS</b> .....	32
4.1	<b>Objetivo Geral</b> .....	32
4.1	<b>Objetivos específicos</b> .....	32
5	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	33
5.1	<b>Caracterização das cepas do estudo</b> .....	33
5.2	<b>Antimicrobianos e Antipsicótico utilizados no estudo</b> .....	33
5.3	<b>Sensibilidade planctônicas de <i>P. aeruginosa</i>, <i>A. baumannii</i> e <i>K. pneumoniae</i> ao haloperidol e antimicrobianos, individuais e em associação</b> .....	33
5.4	<b>Efeito do haloperidol em biofilmes maduros de <i>P. aeruginosa</i>, <i>A. baumannii</i> e <i>K. pneumoniae</i></b> .....	34
5.5	<b>Efeito do haloperidol na sensibilidade dos biofilmes maduros de <i>P. aeruginosa</i>, <i>A. baumannii</i> e <i>K. pneumoniae</i> a antimicrobianos</b> .....	36
5.6	<b>Análise estatística</b> .....	36
6	<b>RESULTADOS</b> .....	38
6.1	<b>Sensibilidade planctônica de <i>P. aeruginosa</i>, <i>A. baumannii</i> e <i>K. pneumoniae</i> ao haloperidol e antimicrobianos individuais e em associação</b> .....	38
6.2	<b>Efeito do haloperidol em biofilmes maduros de <i>P. aeruginosa</i>, <i>A. baumannii</i> e <i>K. pneumoniae</i></b> .....	40
6.3	<b>Efeito do haloperidol na sensibilidade dos biofilmes maduros de <i>P. aeruginosa</i>, <i>A. baumannii</i> e <i>K. pneumoniae</i> a antimicrobianos</b> .....	45
7	<b>DISCUSSÃO</b> .....	46

<b>8</b>	<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>49</b>
<b>9</b>	<b>PERSPECTIVAS.....</b>	<b>50</b>
	<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>51</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Infecções causadas por bactérias multirresistentes, principalmente as relacionadas à assistência à saúde, são um problema crescente no mundo todo por aumentar as taxas de morbidade e mortalidade e associado a isto temos o aumento do tempo de internação de pacientes que conseqüentemente aumenta os gastos com saúde (GARNACHO-MONTERO; AMAYA-VILLAR, 2022). Dentre as infecções microbianas, as mais frequentes nos hospitais são as do trato respiratório, trato urinário e corrente sanguínea (COSTA *et al.* 2019; KERN; RIEG, 2020).

Dentre os agentes etiológicos, destacam-se as bactérias Gram-positivas do gênero *Staphylococcus* e *Streptococcus* e Gram-negativas não fermentadoras dos gêneros *Pseudomonas* e *Acinetobacter* e da família *Enterobacteriaceae* como *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*. Vale destacar que *Pseudomonas aeruginosa* e *Acinetobacter baumannii* resistentes aos carbapenêmicos, e *Enterobacteriaceae* resistentes aos carbapenêmicos e à terceira geração de cefalosporinas, fazem parte da lista de patógenos de prioridade crítica para pesquisa e desenvolvimento de novos antibióticos da Organização Mundial da Saúde (OMS) (TACCONELLI *et al.*; 2018; MANCUSO *et al.*, 2021).

Aliado a isso, o crescimento em estrutura de biofilme confere aos microrganismos associados um decréscimo notório da sensibilidade a antimicrobianos (HEMMATI *et al.*, 2021). Biofilmes podem ser definidos como um agregado organizado de uma ou mais espécies bacterianas que estão envoltos de uma matriz polimérica extracelular que está associada a resistência desses microrganismos aos antimicrobianos (CIOFU *et al.*, 2022) e este efeito na sensibilidade aos antimicrobianos pode ser intrínseco ao modo de crescimento dos biofilmes ou adquirido por meio da transferência de plasmídios de resistência (NOURBAKHSI *et al.*, 2022).

Diante disso, faz-se necessária a busca por novos compostos com atividade antimicrobiana e o reposicionamento de fármacos aparece como uma alternativa viável por ser um processo mais rápido e menos oneroso (RÁCZ; SPENGLER, 2023). Nessa perspectiva, o haloperidol, um antipsicótico de primeira geração, comumente utilizado para o tratamento de esquizofrenia, síndrome de Tourette e distúrbios comportamentais (RAHMAN; MARWAHA, 2022) vem sendo pesquisado por apresentar propriedades antimicrobiana contra *Mycobacterium tuberculosis* (MACHADO *et al.*, 2016), *Candida* spp. (BRILHANTE *et al.*, 2014; HOLBROOK *et al.*, 2017 e ATRIWAL *et al.*, 2021). Poucos são os trabalhos que verificam o potencial antimicrobiano em bactérias Gram-negativas e principalmente na forma de biofilme.

Assim, o presente estudo teve como objetivo avaliar o efeito do haloperidol sobre o crescimento na forma planctônica e biofilme de *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii* e *Klebsiella pneumoniae* e sobre a sensibilidade desses patógenos associado à antibacterianos clássicos.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Resistência bacteriana

Infecções causadas por bactérias multirresistentes são uma problemática mundial em que a Organização Mundial de Saúde (OMS) (2018) afirma que entre as mortes que ocorrem no mundo todo, aproximadamente 25% são causadas por infecções bacterianas em que a resistência antimicrobiana influencia nesses valores (GARNACHO-MONTERO; AMAYA-VILLAR, 2022), dentre essas infecções as mais frequentes no âmbito hospitalar são infecções do trato respiratório, seguida por infecções do trato urinário e da corrente sanguínea (COSTA *et al.* 2019; KERN; RIEG, 2020).

As principais bactérias multirresistentes que estão associadas as infecções citadas são as Gram negativas que estão principalmente ligadas às infecções relacionadas à assistência à saúde gerando um impacto na eficácia do tratamento utilizado para tratar os pacientes (TACCONELLI *et al.*; 2018; MANCUSO *et al.*, 2021).

A resistência antimicrobiana representa uma séria ameaça aos sistemas de saúde em todo o mundo (CDC, 2019). Estima-se que, em 2019, cerca de 4,95 milhões de mortes são diretamente atribuídas à resistência antimicrobiana (FROST *et al.*, 2023). Sendo previsto que esse número aumente em mais de duas vezes em 2050 (DE OLIVEIRA SANTOS *et al.*, 2022).

Além do impacto à saúde humana, a resistência a drogas antimicrobianas também ocasiona prejuízos econômicos, uma vez que as infecções causadas por patógenos multidrogas resistentes (MDR) muitas vezes geram maior tempo de internação e tratamento empírico com antibióticos, gerando maiores custos se comparados a infecções causadas por microrganismos suscetíveis. Anualmente, no Brasil, por exemplo, o custo do tratamento de doenças infecciosas por bactérias MDR é estimado em quase 36 milhões de dólares, sendo quase 20% do gasto federal com a saúde (DE OLIVEIRA SANTOS *et al.*, 2022).

Existem vários mecanismos pelos quais as bactérias podem adquirir resistência, de forma intrínseca, que está ligada a falta de estruturas que fazem com que sejam resistentes aos antimicrobianos, e de forma adquirida em que a resistência ocorre através de mutações gênicas e transferência por plasmídeos. Entretanto, pode-se agrupar esses mecanismos em três grandes grupos: redução da concentração intracelular do antibiótico, modificação do alvo do antibiótico e inativação do antibiótico (HUEMER *et al.*, 2020).

As concentrações intracelulares podem ser mantidas baixas através da permeabilidade diminuída da membrana celular bacteriana. Um exemplo em que isso ocorre é

a diminuição ou a mutação das porinas que permitem a passagem do antibiótico e outra forma de diminuir as concentrações do antibiótico é por meio das bombas de efluxo (HUEMER *et al.*, 2020).

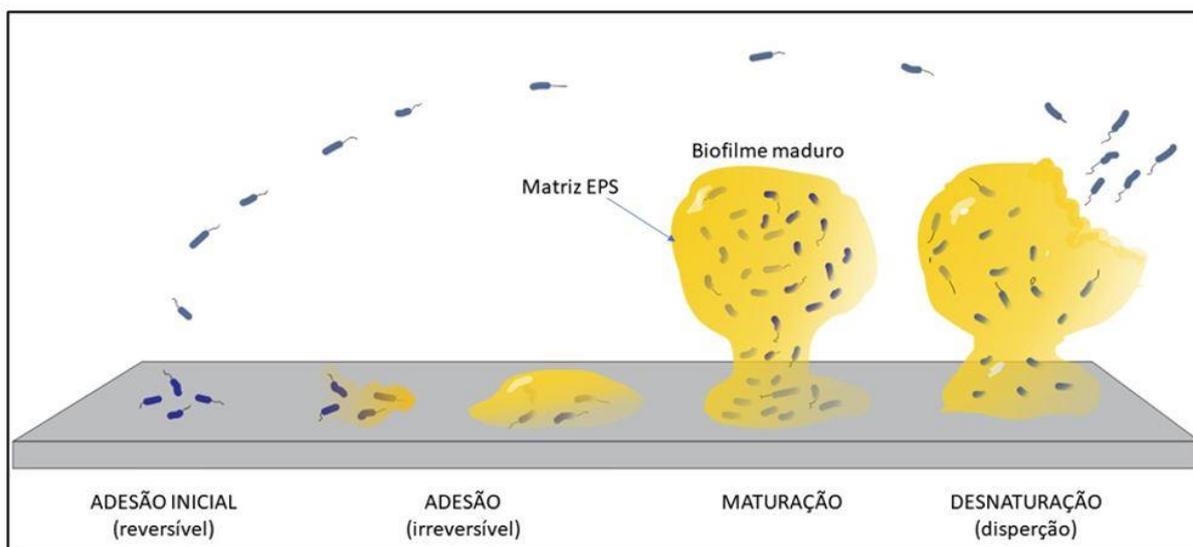
Mutações no alvo molecular de um antibiótico podem acarretar mudanças conformacionais que resultam na ligação ineficaz com o sítio-alvo e ineficácia do antibiótico. Por fim, uma outra forma de resistência é modificando os antibióticos de modo a causar sua inibição, seja pela adição de grupamentos químicos ou pela destruição direta por enzimas bacterianas (HUEMER *et al.*, 2020).

Outra forma de resistência bacteriana bastante importante é o biofilme que pode-se caracterizar como um agregado de microrganismos aderidos entre si e a uma superfície, que produzem uma matriz extracelular que mantém a estrutura da comunidade, favorece a troca de material genético e protege as células do estresse ambiental e do sistema imune do hospedeiro, dificultando o tratamento dessas infecções (MORADALI; GHODS; REHM, 2017; TUON *et al.*, 2022).

Fatores específicos e não específicos estão envolvidos na síntese da matriz e nos processos organizacionais da produção de biofilme. A não especificidade inclui hidrofobicidade, força eletrostática e força de van der Waals. De forma mais complexa, entram em jogo fatores específicos, visto que envolve a expressão coordenada e organizada de genes que codificam adesinas, como adesina polissacarídica intercelular e outras moléculas de adesão, formando células com diversos agregados. Além disso, esses fatores podem estar associados a outras proteínas na superfície microbiana, como fimbrias, flagelos e pili (EXTREMINA *et al.*, 2011; ARCIOLA *et al.*, 2012).

As fases do processo de formação de um biofilme começam com uma adesão inicial reversível das células bacterianas planctônicas, onde em seguida o processo de adesão propriamente dito com a produção da matriz extracelular que se torna irreversível, após isso temos a maturação desses biofilmes onde a matriz formada está bem estabelecida para por fim chegar a fase de desnaturação e dispersão de células planctônicas (PAVÃO *et al.*, 2021).

**Figura 1.** Esquema da formação de biofilme bacteriano



Fonte: PAVÃO *et al.*, 2021.

A OMS (2018) também chama atenção para as infecções relacionadas à assistência à saúde por bactérias capazes de formar biofilme e que muitas dessas infecções estão principalmente relacionadas à colonização e formação de biofilme em dispositivos médicos como cateteres urinários e venoso e tubos endotraqueais (PAVÃO *et al.*, 2021).

A evasão ao sistema imune do biofilme é responsável pela cronificação de diversos quadros clínicos, prolongando o tempo de internação dos pacientes acometidos por essas infecções e aumentando os custos em saúde (RÖMLING; BALSALOBRE, 2012; THI; WIBOWO; REHM, 2020).

A resistência bacteriana a antibióticos tem sido detectada particularmente em patógenos do grupo ESKAPEEc (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter* spp. e *Escherichia coli*), os quais também são as maiores causas de infecções relacionadas à assistência à saúde (IRAS) (MURRAY *et al.*, 2022; JARA *et al.*, 2021).

A lista publicada pela Organização Mundial de Saúde (OMS), que categoriza alguns patógenos bacterianos para os quais urge a pesquisa e o desenvolvimento de novos antibióticos, destacam a importância de três destes: *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii* e *Klebsiella pneumoniae*, os inserindo na categoria de prioridade crítica (MANCUSO *et al.*, 2021).

## 2.2 *Pseudomonas aeruginosa* e seus mecanismos de resistência

O gênero *Pseudomonas* foi descrito pela primeira vez no século XIX, pelo professor Walter Migula, na Alemanha. Pertencente à família *Pseudomonadaceae* a principal representante do gênero, *P. aeruginosa*, antes denominada *Bacillus pyocyaneus*, foi descrita por Carle Gessard, em 1882 (PAZ-ZARZA *et al.*, 2019).

*P. aeruginosa* é um bacilo Gram-negativo não fermentador de glicose (BGNNF), móvel, aeróbio facultativo e mesófilo, mas capaz de sobreviver a temperaturas que variam de 4 a 42°C, o que permite o diferenciar de outras espécies do gênero (DIGGLE; WHITELEY, 2020).

Esse patógeno é comumente associado a infecções relacionadas a assistência à saúde, causando infecções respiratórias crônicas como pneumonia principalmente em pacientes com fibrose cística, causando alta taxa de mortalidade e morbidade, e também pode estar envolvida em infecções do trato urinário e em feridas (BONYADI *et al.*, 2022).

Estima-se que, em algumas regiões do mundo, 15% a 30% das infecções causadas por bactérias multirresistentes sejam por *P. aeruginosa* (HORCAJADA *et al.*, 2019). Nos Estados Unidos, em 2017, foram relatados 32.600 casos de infecções por esse patógeno, ocasionando, aproximadamente, 2.700 mortes, de acordo com o Centro de Controle e Prevenção de Doenças norte americano (CDC, 2019). Em alguns hospitais do Brasil, as infecções por *P. aeruginosa* representam, aproximadamente, 60% das infecções relacionadas a assistência à saúde (URZEDO *et al.*, 2020).

Devido ao aumento dos perfis de multirresistência em *P. aeruginosa*, o arsenal terapêutico tem se tornado cada vez mais limitado. Classes antimicrobianas como as fluorquinolonas, beta-lactâmicos, aminoglicosídeos e carbapenêmicos, que são amplamente utilizadas no tratamento das infecções por esse patógeno, atualmente não têm apresentado eficácia (HILLIAM; KAYE; WINSTANLEY, 2020; WILSON; PANDEY, 2022).

Tal realidade é ocasionada pela expressão de diversos fatores que impossibilitam a ação desses medicamentos, como a produção de enzimas que hidrolizam os antimicrobianos, a exemplo das penicilinases, carbapenemases e cefalosporinas, superexpressão de bombas de efluxo e outros fatores relacionados à redução da permeabilidade da membrana bacteriana, além da capacidade de formar biofilmes, que dificultam ainda mais o manejo dessas infecções (LANGENDONK; NEILL; FOTHERGILL, 2021).

### 2.3 *Acinetobacter baumannii* e seus mecanismos de resistência

O gênero *Acinetobacter* foi descoberto pelo microbiologista Beijerinck no ano de 1911, quando encontrou um novo microrganismo isolado no solo e o nomeou de *Micrococcus calcoaceticus*. Ao longo dos anos, esse microrganismo passou por uma série de modificações em sua classificação taxonômica e atualmente são pertencentes a família *Moraxellaceae* (DIJKSHOORN, 2008; DOUGHARI *et al*, 2011; JUNG; PARK, 2015; ALMASAUDI, 2018).

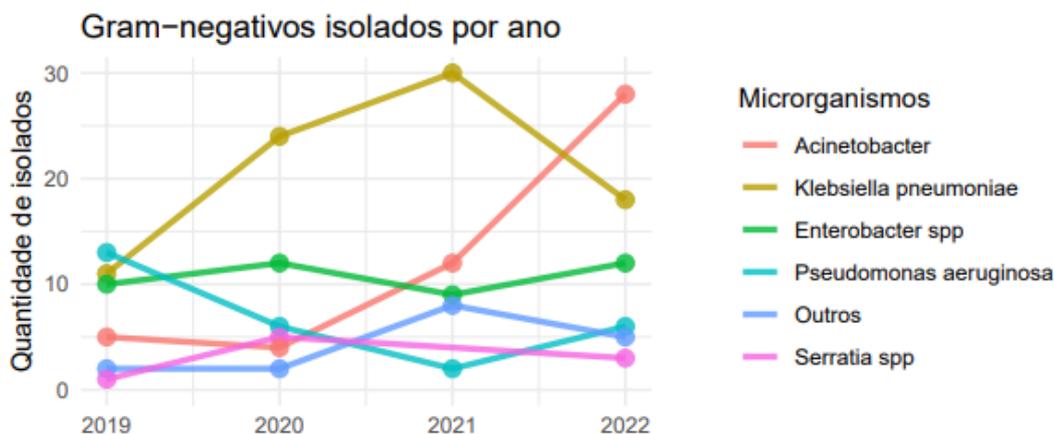
Morfológicamente são caracterizados por cocobacilos Gram-negativos e bioquimicamente como não fermentadores de glicose, imóveis, catalase-positivos e oxidase-negativos. Este gênero compreende 31 espécies descritas, sendo 4 delas (*Acinetobacter calcoaceticus*, *Acinetobacter baumannii*, *Acinetobacter pittii* e *Acinetobacter nosocomialis*) referidas como complexo *A. baumannii-calcoaceticus* devido suas características fenotípicas muito similares (PELEG; SEIFERT; PATERSON., 2008). Dentre estas quatro espécies citadas, a *Acinetobacter baumannii* é a de maior importância clínica.

Conhecida por ser uma espécie oportunista *A. baumannii* raramente causa infecções comunitárias e neste caso normalmente estão associadas à alguma comorbidade. Sua prevalência ocorre no contexto hospitalar, com incidência elevada em Unidades de Terapia Intensiva (UTI), sendo as principais infecções: infecções do trato respiratório, da corrente sanguínea e do trato urinário (PELEG; SEIFERT; PATERSON., 2008; ALMASAUDI, 2018; QUEIROZ; MACIEL; SANTOS, 2022).

No Brasil, os relatos de surtos tiveram início no ano de 1999, no estado de Curitiba, onde houve o primeiro registro do surto de cepas multirresistentes sendo identificadas, nesse caso, cepas produtoras carbapenemase do tipo oxacilinase 23, que é uma enzima capaz de hidrolisar antimicrobianos da classe dos carbapenêmicos. As regiões sul e sudeste se sobressaem, apresentando os maiores números de caso incidentes de cepas multirresistentes de *Acinetobacter* spp. (VIEIRA; PICOLI, 2015).

No Ceará, o gênero representa um dos principais bacilos Gram negativos associados a infecções em UTIs pediátricas, principalmente, as Infecções Primárias de Corrente Sanguínea Laboratorial (IPCSL). É o que demonstra os dados do relatório de IRAS e resistência microbiana (RM) em serviços de saúde do Ceará referente ao período de janeiro de 2012 a dezembro de 2022 disponibilizados pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA, 2022).

**Figura 2.** Prevalência de microrganismos causadores de IPCSL em UTIs pediátricas no Ceará.



Fonte: ANVISA, 2022.

*Acinetobacter baumannii* é intrinsecamente resistente a muitos antimicrobianos, como: glicopeptídeos, macrolídeos, lincosamidas e estreptograminas (NOWAK; PALUCHOWSKA, 2016). Além disso, as opções terapêuticas ainda utilizadas como amicacina, tigeciclina, colistina e polimixina, em monoterapia ou de forma associada, são muitas vezes inefetivas devido aos diversos perfis de resistência. Isso torna necessária a busca por novos compostos e fármacos que sejam capazes de combater essas bactérias (ISLER *et al.* 2018; IBRAHIM; *et al.*, 2021).

Dentre os mecanismos de resistência apresentados por essa espécie, estão: inativação enzimática, efluxo ativo, diminuição da permeabilidade da membrana e modificação dos sítios alvo de ligação aos antimicrobianos (DALMASIO, 2018; QUEIROZ *et al.*, 2022).

Desses, a superexpressão de bombas de efluxo classificam-se como um importante recurso utilizado por *A. baumannii* para torná-lo mais resistente, há o efluxo dos antimicrobianos na célula bacteriana. Nessa espécie, pode-se encontrar as bombas do tipo *Resistance Nodulation Division (RND) AdeABC*, a qual é responsável pela resistência a aminoglicosídeos, quinolonas, tetraciclina, cloranfenicol, eritromicina e trimetoprima (NOWAK; PALUCHOWSKA, 2016; ALMASAUDI, 2018).

Outro fator que explica o tratamento difícil e o grande número de transmissão e infectados no ambiente hospitalar é a capacidade de *A. baumannii* de se estabelecer e formar biofilmes em superfícies bióticas e abióticas por um longo período, visto que pode se adaptar

e sobreviver em diversas superfícies mesmo sob condições de nutrição limitadas (PELEG; SEIFERT; PATERSON., 2008; KANAFANI; KANJ, 2014; ALMASAUDI, 2018).

#### **2.4 *Klebsiella pneumoniae* e seus mecanismos de resistência**

*Klebsiella pneumoniae* (*Klebsiella*, nomeado segundo Klebs; *pneumoniae*, inflamação dos pulmões) é um bacilo Gram-negativo fermentador de glicose que há muito tempo foi reconhecido como agente causador de doenças, sendo primeiro descrito como causa de pneumonia por Carl Friedländer, em 1882, e permanecendo hoje como um dos principais patógenos associados a infecções associadas à assistência à saúde e sepse neonatal (WYRES; LAM; HOLT, 2020).

Pertencente ao gênero *Klebsiella* e à família *Enterobacteriaceae*, *K. pneumoniae* pode sobreviver em diversos nichos ecológicos, de forma livre ou associada a um hospedeiro. Esses nichos incluem o solo, a água, uma variedade de espécies vegetais, insetos, aves, répteis e muitos mamíferos, com os quais essa espécie pode desenvolver uma relação comensal ou um potencial patógeno (WYRES; LAM; HOLT, 2020).

A maioria das infecções por *K. pneumoniae* no mundo são infecções oportunistas associadas à assistência à saúde. Suas manifestações principais são pneumonias, infecções do trato urinário e feridas infectadas, qualquer uma delas podendo progredir para a bacteremia, especialmente em grupos vulneráveis (neonatos, idosos, pacientes com dispositivos médicos e imunocomprometidos). Além disso, a bactéria pode estar associada a abscessos hepáticos, infecções de tecidos moles, endoftalmites e meningites (WYRES; LAM; HOLT, 2020).

Entretanto, essa espécie vem adquirindo elementos genéticos que lhe conferem resistência. Atualmente, *K. pneumoniae* produtoras de  $\beta$ -Lactamases de Espectro Estendido (ESBL) e de carbapenemases (MDR-Kp) estão presentes no mundo todo, causando infecções de difícil manejo (WANG *et al.*, 2020a).

Com o surgimento de cepas resistentes, o tratamento das infecções por *K. pneumoniae* tem se tornado mais limitado. O arsenal terapêutico disponível para o tratamento das infecções por este patógeno é composto por aminoglicosídeos, glicilciclinas, fluorquinolonas, carbapenêmicos e a combinação de ceftazidima com avibactam (VIVAS *et al.*, 2020; HUEMER *et al.*, 2020; JARA *et al.*, 2021).

Os aminoglicosídeos, representados por amicacina e gentamicina, e o grupo das glicilciclinas, que é parte das tetraciclinas, agem bloqueando a síntese proteica da bactéria. Já o grupo dos carbapenêmicos é representado por meropenem, ertapenem e imipenem, os quais

inibem a síntese da parede celular bacteriana e possuem o maior espectro entre os  $\beta$ -lactâmicos (WANG *et al.*, 2020a; VIVAS *et al.*, 2020; RODRIGUES *et al.*, 2021).

Outro grupo de antibióticos, as polimixinas, como a colistina e a polimixina B, agem causando o rompimento das membranas externas da bactéria. Esses dois fármacos, junto com a amicacina, a fosfomicina e a tigeciclina, têm sido mais utilizados em cepas resistentes ao grupo dos carbapenêmicos (LONGO *et al.*, 2019).

Na Europa, *K. pneumoniae* é responsável por mais de noventa mil infecções e sete mil mortes anualmente e contribuiu para 19,9% das mortes atribuídas à resistência antimicrobiana em 2019 (MURRAY *et al.*, 2022; WYRES; LAM; HOLT, 2020).

Os mecanismos de resistência de *K. pneumoniae* são variados, sendo o mais conhecido e mais citado a produção de  $\beta$ -Lactamases de Espectro Estendido (ESBL) e de carbapenemases. Sendo também relatada a importância de bombas de efluxo na disseminação das  $\beta$ -lactamases e na resistência contra outros grupos de antibióticos (WANG *et al.*, 2020a).

Microrganismos produtores de ESBL são descritos como um grupo de bactérias resistentes à maioria dos fármacos comumente referidos como última escolha na antibioticoterapia, sendo capazes de hidrolisar ampicilina, da primeira à terceira geração das cefalosporinas e os monobactâmicos (aztreonam). Nesses casos, a opção terapêutica seria o grupo do carbapenêmicos, uma vez que possuem um amplo espectro de ação bactericida e certa estabilidade contra a maioria das  $\beta$ -lactamases (DE OLIVEIRA SANTOS *et al.*, 2022).

*K. pneumoniae* carbapenemases (KPC), dentre as carbapenemases, está entre as enzimas mais isoladas no mundo e tem a capacidade de hidrolisar uma ampla variedade de fármacos, como as penicilinas, as cefalosporinas, os carbapenêmicos e os monobactâmicos. Além disso, cepas produtoras de KPC são comumente resistentes a fluoroquinolonas e aminoglicosídeos. Antibióticos como tigeciclina, colistina e polimixina B têm sido utilizados como agentes de última escolha, embora já se tenha casos de resistência a eles (DE OLIVEIRA SANTOS *et al.*, 2022).

Em relação às polimixinas, os casos de cepas resistentes a esse antimicrobiano têm crescido, com estudos reportando uma frequência de 27% no ano de 2019 no Brasil. Entre os principais mecanismos de resistência descritos, tem-se com frequência a modificação do sítio-alvo, mais especificamente do lipídeo A do LPS. Como alternativa terapêutica, restam a tigeciclina, a amicacina e a fosfomicina (LONGO *et al.*, 2019).

## **2.5 Reposicionamento de fármacos e busca por fármacos com potencial antimicrobiano**

Conforme citado anteriormente, a partir de 2019 a OMS começou a alertar para a problemática crescente das bactérias multirresistentes, tendo visto que a transferência de genes de resistência de uma bactéria para outra de forma horizontal demora bem menos quando comparamos com a velocidade em que são descobertas novas classes de antimicrobianos (LIU *et al.*, 2021).

Tacconelli *et al.* (2018) apontam que, as quinolonas, descobertas em 1962, foram a última nova classe de antimicrobianos com ação sobre bactérias Gram-negativas. Tal realidade é, em parte, consequência das dificuldades encontradas no processo de desenvolvimento de novos antimicrobianos, isto porque o processo para o desenvolvimento é muito oneroso e, o processo de aprovação pela *Food and Drug Administration* (FDA) pode ser muito longo. Além disso, o retorno econômico é baixo em comparação com as descobertas de medicamentos para outras doenças (SCHEIN, 2019).

O termo reposicionamento de fármacos (RF) ou reaproveitamento de fármacos é comumente utilizado para descobrir novas atividades, ou seja, novos usos e aplicações terapêuticas, de fármacos já utilizados clinicamente. Este é o processo de encontrar novos usos fora da indicação médica original para um medicamento ou composto aprovado que foi descontinuado por um motivo ou outro. como redirecionamento, redefinição, reatribuição, reanálise, etc (SILVA, 2015).

Contudo, diversas classes de fármacos como inibidores de canais de cálcio, anti-histamínicos, e principalmente medicamentos psicotrópicos que atuam como inibidores seletivos de recaptação da serotonina têm demonstrado potencial atividade antimicrobiana em bactérias multirresistentes (K BHARDWAJ; MOHANTY, 2012; DE SOUZA *et al.*, 2018).

### **2.5.1 Fármacos psicotrópicos**

Drogas antipsicóticas têm sido amplamente estudadas como opções para o reposicionamento de fármacos em concentrações inibitórias mínimas subinibitórias, dado a sua segurança farmacocinética, farmacodinâmica e longa aplicação clínica (HUANG *et al.*, 2016).

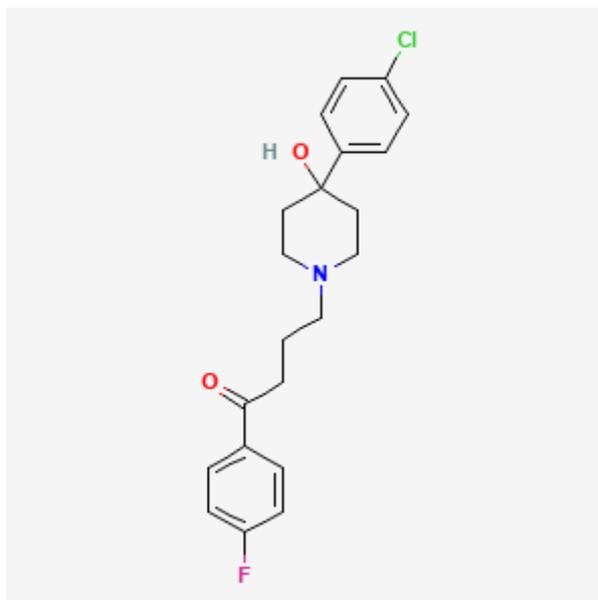
Desde 1959, a partir da observação do efeito antimicrobiano da clorpromazina frente às micobactérias, diversos estudos têm relatado o efeito de fármacos psicotrópicos contra agentes bacterianos e fúngicos (ELLEZIAN *et al.*, 2022; NEHME *et al.*, 2018; MORAES; FERREIRA-PEREIRA, 2019).

A sertralina também vem sendo estudada e descrita como um potencial fármaco capaz de inibir o crescimento microbiano e reduzir o biofilme em *Listeria monocytogenes* (WANG et al., 2023). Temos também a fluoxetina que também apresentou concentrações inibitórias mínimas para *P. aeruginosa*, *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* em um trabalho de De Souza e colaboradores (2018), em um trabalho de Ait Chait (2020) envolvendo diversos fármacos psicotrópicos como aripiprazol, brupropiona, desipramina, citalopram, apresentaram atividade antimicrobiana contra *Lactobacillus casei*, *Enterococcus faecium*, *Bacteroides fragilis*, *Akkermansia muciniphila*, *Clostridium leptum*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Escherichia coli*, *Eubacterium rectale*, *Faecalibacterium prausnitzii*, bactérias comensais do trato gastrointestinal, dentre esses agentes, o haloperidol também tem se apresentado como um desses agentes com efeitos antimicrobianos (EL-GANINY et al., 2022).

#### 2.5.1.1 Haloperidol

O haloperidol é um agente antipsicótico de primeira geração, pertencente à classe das butirofenonas, amplamente utilizado no mundo para controlar os sintomas da esquizofrenia, síndrome de Tourette, hiperatividade e outros distúrbios comportamentais graves, tendo uma ótima eficácia principalmente em crianças. De modo off-label, tem sido comumente aplicado para agitação associada a distúrbios psiquiátricos, mania aguda, náuseas e vômitos induzidos por quimioterapia e para a gestão de soluços intratáveis (OSTINELLI, E. G. et al., 2017; RANG, 2020).

**Figura 3.** Estrutura química do haloperidol



Fonte: Beach *et al.*, 2020.

Sua posologia varia entre 0,5 a 2 miligramas 3 vezes ao dia para adultos com uma dose de manutenção variando entre 1 e 15 miligramas ao dia, sua biodisponibilidade na formulação oral é de 60 a 70% enquanto seu pico plasmático ocorre de 2 a 6 horas após a administração oral e em 20 minutos após a intramuscular (Bula do haloperidol, 2023).

O haloperidol pode ser administrado pelas mais diversas vias, sendo as principais oral e intramuscular. O fármaco apresenta uma taxa de ligação às proteínas plasmáticas entre 88 e 92% e um volume de distribuição entre cerca de 8 a 21 L/Kg, a depender da biodisponibilidade da droga. Quanto ao tempo de meia-vida, o haloperidol apresenta um intervalo de flutuação plasmática entre 12 e 24 horas antes de atingir a eliminação de 50%, variando conforme a dose e a via escolhida para administração (SHEN, Y. *et al.*, 2018).

O mecanismo de ação do haloperidol consiste no bloqueio dos receptores de dopamina D2 no cérebro, no entanto, este fármaco não é seletivo para o receptor D2, apresentando também afinidade com os receptores D1,  $\alpha$ 1, H1 e 5-HT2A, justificando a sua ação bloqueadora noradrenérgica, colinérgica e histaminérgica. O bloqueio desses receptores está associado a várias reações adversas a medicamentos e ao seu potencial risco de reação extrapiramidal (BEACH *et al.*, 2020; RANG, 2020).

No que se refere ao seu perfil farmacocinético e farmacodinâmico, por ser um fármaco lipofílico, o haloperidol é bem absorvido pelo trato gastrointestinal e pela via intramuscular, sendo rapidamente distribuído a vários tecidos e órgãos, o que também explica a sua capacidade de atravessar a barreira hematoencefálica (BHE) e a placenta, podendo ser excretado no leite materno. O antipsicótico é extensamente metabolizado no fígado, sendo

que as principais vias metabólicas em humanos incluem glicuronidação, redução de cetonas, N-dealquilação oxidativa e formação de metabólitos piridínicos, sem nenhuma via gerar algum metabólico significativamente importante para a sua ação farmacológica. Experimentalmente, constatou-se que, após administração intravenosa, 21% da dose é eliminada nas fezes e 33% na urina. Além disso, notou-se que 3% da dose é excretada inalterada na urina (Bula do haloperidol, 2023; RANG, 2020).

Os efeitos tóxicos associados ao uso do haloperidol são identificados através de sintomas extrapiramidais graves, hipotensão e sedação, que podem conduzir o indivíduo ao coma. Devido a isso, os pacientes que utilizam o fármaco necessitam ser acompanhados por profissionais de saúde, garantindo a adesão à terapia, o monitoramento das concentrações plasmáticas e o bem-estar do indivíduo (KISHI *et al.*, 2021).

O uso do haloperidol como inibidor de bomba de efluxo é também relatado e comprovado por meio da identificação de expressão gênica das bombas em fungos, principalmente do gênero *Candida*, onde o mecanismo de resistência por bomba de efluxo é uma importante forma de sobrevivência aos antifúngicos utilizados na terapia contra esses microrganismos, sendo escasso trabalhos que avaliem o potencial de inibição das bombas de efluxo em bactérias (JI *et al.*, 2020; El-GANINY *et al.*, 2022).

Outro mecanismo relatado são os compostos piridínicos produzidos pelo haloperidol que atuam como dispersantes agindo no biofilme de forma a desestruturar e dispersar o biofilme de patógenos microbianos (ALLEN *et al.*, 2018).

Levando em consideração os efeitos do haloperidol encontrados na literatura, estima-se que ele possa ser um potencial fármaco, com propriedades antimicrobianas, que possa ser utilizado com o intuito de enfrentar a problemática das bactérias resistentes aos antimicrobianos assim como a produção de biofilme pelas mesmas.

### 3 HIPÓTESES

1. Haloperidol apresenta atividade antibacteriana contra *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii* e *Klebsiella pneumoniae*;
2. Haloperidol é capaz de desestruturar o biofilme de *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii* e *Klebsiella pneumoniae*;
3. Haloperidol é capaz de potencializar a ação dos antibacteriana comumente utilizados para tratar infecções por *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii* e *Klebsiella pneumoniae*.

## 4 OBJETIVOS

### 4.1 Objetivo Geral

Avaliar o efeito antibacteriano e antibiofilme do antipsicótico haloperidol em *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii* e *Klebsiella pneumoniae*.

### 4.2 Objetivos Específicos

1. Determinar as Concentrações Inibitórias Mínimas (CIMs) do haloperidol contra *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii* e *Klebsiella pneumoniae*;
2. Analisar o efeito do haloperidol sobre a atividade metabólica e biomassa de biofilmes maduros de *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii* e *Klebsiella pneumoniae*;
3. Caracterizar as associações de haloperidol com os antimicrobianos ciprofloxacina, meropenem e amicacina sobre os isolados planctônicos e em biofilmes maduros de *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii* e *Klebsiella pneumoniae*.

## 5 MATERIAL E MÉTODOS

### 5.1 Caracterização das cepas do estudo

Foram utilizados 16 isolados clínicos de bactérias Gram negativas (5 *Pseudomonas aeruginosa* 3 multirresistentes e 2 sensíveis, 6 *Acinetobacter baumannii* 4 multirresistentes e 2 sensíveis e 5 *Klebsiella pneumoniae* 3 multirresistentes e 2 sensíveis), além das cepas de referência *P. aeruginosa* ATCC 27853 e *K. pneumoniae* ATCC 700603. As cepas foram provenientes da coleção do Laboratório de Bacteriologia do Grupo Aplicado em Microbiologia Médica (GrAMM), da Universidade Federal do Ceará (UFC), estavam estocadas em -20 °C em meio caldo Triptona de Soja (TSB) adicionado 20% de glicerol, onde, para utilização durante os experimentos essas cepas foram repicadas em caldo BHI para reestabelecerem seu metabolismo.

### 5.2 Antibióticos e antipsicótico utilizados no estudo

Os antimicrobianos ciprofloxacino – CIP (Sigma, Brasil), meropenem – MER (Sigma, Brasil) e amicacina – AMK (Sigma, Brasil) foram preparados na concentração estoque de 5 mg/mL, conforme recomendado pelo documento M100-M07 (CLSI, 2021). O antipsicótico haloperidol (União Química, Brasil) foi obtido em ampolas na concentração de 5 mg/mL.

### 5.3 Atividade antibacteriana do haloperidol e antibióticos clássicos em células planctônicas de *P. aeruginosa*, *A. baumannii* e *K. pneumoniae*

As CIMs do haloperidol (União Química, Brasil) e dos antibacterianos ciprofloxacina (Sigma, Brasil), meropenem (Sigma, Brasil) e amicacina (Sigma, Brasil) foram determinados de acordo com o protocolo do Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI, 2021). Os antimicrobianos foram testados nas concentrações variando de 0,125 - 64 µg/mL e o haloperidol de 2 - 512 µg/mL.

Inicialmente, as cepas previamente acordadas em caldo BHI foram semeadas em ágar BHI e incubadas por 24 horas a 37 °C para permitir o crescimento da colônia. Após esse tempo, um inóculo bacteriano foi preparado usando colônias na escala de McFarland 0,5 e diluído até uma concentração final de  $5 \times 10^5$  UFC/mL. 100 µL desse inóculo foi adicionado a placas de microdiluição de 96 poços de fundo U após a adição de meio de cultura e diluições

sucessivas dos antimicrobianos. As placas foram incubadas em estufa bacteriana a 37 °C por 24 horas e lidas por turbidez visualmente para encontrar a concentração inibitória mínima (CIM), definida como a menor concentração capaz de inibir 100% do crescimento bacteriano (CLSI, 2021). *P. aeruginosa* ATCC 27853 foi incluída para validação das drogas utilizadas no estudo. Os poços sem droga foram usados como controles de crescimento e os poços apenas com meio foram usados como controles de esterilidade. Todos os experimentos foram realizados em duplicata em momentos diferente.

Para avaliação do efeito do haloperidol sobre a sensibilidade das bactérias aos antibióticos clássicos, o haloperidol foi adicionado ao meio de cultura em concentrações subinibitórias (CIM/2 e CIM/4) e as drogas ciprofloxacina, meropenem e amicacina foram adicionadas nas concentrações de 0,0125 - 64 µg/ml. Por fim, os inóculos bacterianos foram preparados na concentração de  $5 \times 10^5$  CFU/ml e adicionados 100 µL as placas de 96 poços de fundo U onde os antimicrobianos foram dispostos em concentrações de 0,0125 - 64 µg/ml (CLSI, 2021; SIDRIM *et al.*, 2019). Todos os experimentos foram realizados em duplicata em momentos diferente.

#### **5.4 Efeito do haloperidol em biofilmes maduros de *P. aeruginosa*, *A. baumannii* e *K. pneumoniae***

No primeiro momento, foi realizada a caracterização da formação de biofilme das cepas. Para tanto, as cepas foram cultivadas em caldo BHI à 37 °C por 24 h. Posteriormente, as cepas (n=6 para cada espécie) foram cultivadas em ágar BHI a 37 °C por 24 h. Após o crescimento, as células foram suspensas em solução salina estéril para obter turbidez de 6 na escala de McFarland, que corresponde a  $1,8 \times 10^8$  células/mL. A formação dos biofilmes foi induzida em placas de 96 poços de fundo chato, de acordo com a metodologia proposta por Sidrim e colaboradores (2020), com adaptações, contendo caldo BHI suplementado com glicose 1% (BHI-1% glicose) e usando uma relação inóculo: meio de cultura de 1:7 (v/v).

Após 48 horas de crescimento, o sobrenadante foi descartado e os poços foram lavados uma vez com PBS. As bactérias aderidas restantes foram fixadas com 200 µL de metanol 99% por poço e, após 15 minutos, as placas foram esvaziadas e deixadas para secar. Em seguida, as placas foram coradas por 10 min com 200 µL de cristal violeta a 0,3%. O cristal foi removido e os poços foram lavados 200 µL de água destilada estéril. Após secagem, o corante ligado às células aderentes foi resolubilizado com 200 µL de ácido acético glacial a 33% (v/v) por poço. A densidade óptica (DO) de cada poço foi medida em espectrofotômetro

a 490nm.

Posteriormente, os valores de DO obtidos a partir de poços contendo meio de cultura, sem inóculo de bactérias, foram utilizados como controle negativo para o crescimento de biofilme. Com base nos valores de DO do controle negativo, o valor de corte (DO<sub>c</sub>) para o teste, para classificar as cepas como produtoras de biofilme, foi definido como três desvios-padrão acima da média de DO observada para o controle negativo. No final, as cepas foram classificadas como não produtoras de biofilme (DO ≤ DO<sub>c</sub>), fracas produtoras de biofilme (DO<sub>c</sub> < DO ≤ 2 × DO<sub>c</sub>), moderadas produtoras de biofilme (2 × DO<sub>c</sub> < DO ≤ 4 × DO<sub>c</sub>) ou fortes produtoras de biofilme (4 × DO<sub>c</sub> < DO) (STEPANOVIĆ *et al.*, 2007). Todos os testes foram realizados em duplicata.

No segundo momento, foi avaliado o efeito do haloperidol sobre os biofilmes maduros (n=16). Após 48 da formação do biofilme, foram adicionados 200 mL de BHI-1% de glicose contendo diluições seriadas de Haloperidol (2–512 µg/mL). As placas foram então incubadas a 37 °C, por mais 24 h. Posteriormente, foi avaliado efeito do haloperidol sobre a atividade metabólica utilizando resazurina (0,025%), visando determinar a concentração mínima de erradicação do biofilme (CEMB), definida como a menor concentração na qual não foi observada atividade metabólica (SIDRIM *et al.* 2020). A biomassa foi quantificada pela técnica de coloração com cristal violeta (SIDRIM *et al.* 2020).

Os testes foram realizados em triplicata, em dois momentos distintos. Poços livres de drogas foram incluídos como controle de crescimento, enquanto poços contendo apenas meio de cultura foram usados como controle de esterilidade.

Adicionalmente, foi avaliado o efeito do haloperidol na conformação estrutural dos biofilmes maduros por microscopia confocal. Para tanto, foi selecionada uma cepa forte formadora de biofilme de cada espécie. Os biofilmes foram cultivados em uma placa de poliestireno de 24 poços contendo uma lamínula de vidro (1 cm de diâmetro) no fundo do poço, seguindo mesma metodologia descrita para formação de biofilme, com um inóculo de 1,8 x 10<sup>9</sup> UFC/mL, ajustando o volume total (inóculo e BHI-caldo glicose 1%) para 1000 mL e mantendo a mesma relação meio de cultura:inóculo (7:1 v/v).

Após 24 horas de incubação à 37 °C, a CEMB do haloperidol foi adicionada no biofilme maduro *K. pneumoniae* e *A. baumannii*. Como não identificamos CEMB na maior concentração testada em *P. aeruginosa*, o haloperidol foi utilizado na concentração de 1024 µg/mL. O biofilme foi incubado por mais 24h, e em seguida, as lamínulas foram colocadas em placas de Petri com fundo de lâmina, contendo 50 mL de corante fluorescente Live/Dead (Invitrogen™, EUA) diluído em água destilada estéril, conforme recomendação do fabricante.

Posteriormente, os biofilmes foram avaliados em Microscópio Confocal Nikon C2, com aumento de 600x (7 campos), a 488nm para detecção do corante fluorescente SYTO9, que identifica células bacterianas vivas, e 561nm para detecção de iodeto de propídio, que identifica células mortas/células bacterianas danificadas. Imagens Z-stack foram analisadas com o software COMSTATM e os parâmetros biomassa, espessura média da biomassa, espessura de toda a área, coeficiente de rugosidade e relação superfície-volume foram calculados e comparados entre os obtidos para os biofilmes expostos ao haloperidol e os obtidos para o controle de crescimento não exposto (SIDRIM *et al.*, 2020).

### **5.5 Efeito do haloperidol na sensibilidade aos antimicrobianos em biofilmes maduros dos microrganismos em estudo**

Para avaliar o efeito do haloperidol sobre a sensibilidade do biofilme maduro a antibacterianos clássicos, o biofilme foi formado como descrito anteriormente e incubado por 24h. Após esse período, os biofilmes maduros foram lavados e expostos a concentrações dos antibacterianos isolados (0,5-256 µg/mL) e em combinação (8-256 µg/mL) com o haloperidol em concentrações subinibitórias (CEMB/2 e CEMB/4) que foram incorporadas ao meio junto ao inóculo.

As placas foram incubadas a 37 °C, por 48 h (SIDRIM *et al.*, 2020). Após esse período, 20 µL de resazurina (0,025%) foram adicionados a todos os poços, as placas foram incubadas por 1h a 37 °C, para detectar a atividade metabólica do biofilme (SIDRIM *et al.*, 2020). Os testes foram realizados em duplicata, em momentos distintos. Poços livres de drogas foram usados como controle de crescimento, enquanto poços contendo apenas meio de cultura foram usados como controle de esterilidade.

### **5.6 Análise estatística**

Para avaliar o efeito do haloperidol na sensibilidade antimicrobiana das cepas de *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae* e *A. baumannii* em formas planctônicas e de biofilme, as CIMs, CEMBs, os valores obtidos das leituras de absorbância e das análises do confocal, para as drogas isoladas e em combinação, foram comparadas usando o Teste t de Mann-Whitney para os dados que apresentaram distribuição assimétrica e Teste t não pareado para dados simétricos.

Para todas as análises, valores de P inferiores a 5% foram considerados estatisticamente significativo. As análises estatísticas foram realizadas usando o software GraphPad Prism 9.0.

## 6 RESULTADOS

### 6.1 Atividade antibacteriana do haloperidol e antibióticos clássicos em células planctônicas de *P. aeruginosa*, *A. baumannii* e *K. pneumoniae*

Haloperidol mostrou CIMs variando de 64 a 512 µg/mL, sendo a média geométrica contra *P. aeruginosa* (MG = 512) superior as médias encontradas contra *A. baumannii* (MG = 80,6) e *K. pneumoniae* (MG = 143,7). Houve diferença estatística entre todas as espécies quando comparadas entre si com  $p < 0,05$  (**Tabela 1**).

Em relação aos antibióticos, as CIMs de ciprofloxacina variaram de  $<0,125 - 16$  µg/mL em *P. aeruginosa* (MG = 1,5);  $0,25 - >64$  em *A. baumannii* (MG = 14,2) e  $<0,125 - 64$  µg/mL em *K. pneumoniae* (MG = 2,4). Para meropenem, foram observadas CIMs de  $<0,125 - \geq 64$  µg/mL em *P. aeruginosa* (MG = 6,2); *A. baumannii* (MG = 4) e *K. pneumoniae* (MG = 3,6). Quanto a amicacina, as CIMs foram de  $0,5 - 16$  µg/mL em *P. aeruginosa* (MG = 3,5);  $16 - >64$  em *A. baumannii* (MG = 64) e  $0,5 - 64$  µg/mL em *K. pneumoniae* (MG = 10,5) (**Tabela 1**).

Na associação do haloperidol com os antibacterianos contra as cepas de *A. baumannii* na forma de crescimento planctônico, observou-se que houve uma redução no CIM da AMK quando combinado com o haloperidol (CIM/2), com média geométrica baixando de 64 para 5 ( $p < 0,05$ ). Para todas as outras associações não houve redução significativa (**Tabela 1**).

Tabela 1 - Concentração inibitória mínima (CIM) de haloperidol, ciprofloxacina (CIP), meropenem (MER) e amicacina (AMK) isolado e em associação contra *Pseudomonas aeruginosa* (n=6), *Acinetobacter baumannii* (n=6) e *Klebsiella pneumoniae* (n=6).

Cepas (GrAMM)	Origem	Haloperidol (µg/mL)		CIP (µg/mL)		MER (µg/mL)			AMK (µg/mL)		
		Isolado	Isolado	+Haloperidol (CIM/2)	+Haloperidol (CIM/4)	Isolado	+Haloperidol (CIM/2)	+Haloperidol (CIM/4)	Isolado	+Haloperidol (CIM/2)	+Haloperidol (CIM/4)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 01	Aspirado Traqueal	512	8 (R)	64	64	>64 (R)	16	16	16 (S)	4	8
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 02	Ponta de Catéter	512	8 (R)	64	64	>64 (R)	>64	>64	16 (S)	4	8
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 03	Sangue	512	16 (R)	64	64	64 (R)	64	>64	8 (S)	8	2
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 04	Ferida	512	<0,125 (S)	0,25	0,25	0,5 (S)	0,5	0,5	0,5 (S)	0,5	0,5
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 05	Ferida	512	0,5 (S)	0,5	0,5	<0,125 (S)	<0,125	0,25	0,5 (S)	1	1
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 27853	512	0,25	0,25	0,25	0,5	0,5	0,5	1	0,5	0,5
<b>Média Geométrica</b>		<b>512</b>	<b>1,4</b>	<b>4,5</b>	<b>4,5</b>	<b>5,7</b>	<b>3,6</b>	<b>5,0</b>	<b>2,8</b>	<b>1,8</b>	<b>1,8</b>
<i>Acinetobacter baumannii</i> 01	Ponta de Catéter	128	>64 (R)	64	>64	64 (R)	4	32	>64 (R)	1	64
<i>Acinetobacter baumannii</i> 02	Aspirado Traqueal	128	>64 (R)	2	16	16 (R)	8	8	>64 (R)	8	16
<i>Acinetobacter baumannii</i> 03	Aspirado Traqueal	64	64 (R)	8	32	16 (R)	8	32	>64 (R)	16	32
<i>Acinetobacter baumannii</i> 04	Aspirado Traqueal	64	>64 (R)	>64	>64	64 (R)	16	32	>64 (R)	>64	>64
<i>Acinetobacter baumannii</i> 05	Sangue	64	0,25 (S)	<0,125	<0,125	0,25 (S)	<0,125	<0,125	16 (S)	1	1
<i>Acinetobacter baumannii</i> 06	Aspirado Traqueal	64	0,25 (S)	<0,125	<0,125	<0,125 (S)	<0,125	<0,125	16 (S)	1	4
<b>Média Geométrica</b>		<b>80,6</b>	<b>14,3</b>	<b>2,8</b>	<b>5,7</b>	<b>5,0</b>	<b>1,6</b>	<b>3,2</b>	<b>64,0</b>	<b>5,0*</b>	<b>16,0</b>
<i>Klebsiella pneumoniae</i> 01	Ponta de Catéter	128	64 (R)	64	>64	>64 (R)	16	8	64 (R)	64	64
<i>Klebsiella pneumoniae</i> 02	Aspirado Traqueal	128	64 (R)	8	4	>64 (R)	<0,125	0,5	64 (R)	64	64
<i>Klebsiella pneumoniae</i> 03	Sangue	128	64 (R)	16	64	>64 (R)	>64	>64	64 (R)	64	64
<i>Klebsiella pneumoniae</i> 04	Sangue	128	<0,125 (S)	<0,125	<0,125	<0,125 (S)	<0,125	<0,125	1 (S)	1	1
<i>Klebsiella pneumoniae</i> 05	Sangue	128	<0,125 (S)	<0,125	<0,125	<0,125 (S)	<0,125	<0,125	0,5 (S)	1	1
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	ATCC 700603	128	<0,125 (S)	<0,125	<0,125	<0,125 (S)	<0,125	<0,125	0,5 (S)	1	1
<b>Média Geométrica</b>		<b>143,7</b>	<b>2,0</b>	<b>1,1</b>	<b>1,4</b>	<b>2,8</b>	<b>0,6</b>	<b>0,7</b>	<b>6,3</b>	<b>8,0</b>	<b>8,0</b>

S – Cepa classificada como sensível de acordo com os critérios do BrCast; R – Cepa classificada como resistente de acordo com os critérios do BrCast / \*Indica diferença estatisticamente significativa (p < 0,05) quando comparado o MIC da combinação com o MIC do antibacteriano isolado.

Fonte: Elaborada pelo autor.

## 6.2 Efeito do haloperidol em biofilmes maduros de *P. aeruginosa*, *A. baumannii* e *K. pneumoniae*

Todas as 18 cepas avaliadas nesse estudo foram capazes de formar biofilme, sendo 5 cepas forte formadoras de biofilme (2 *P. aeruginosa*, 1 *A. baumannii* e 2 *K. pneumoniae*), 8 moderadas formadoras (3 *P. aeruginosa* e 5 *A. baumannii*) e 5 fracas formadoras (1 *P. aeruginosa* and 4 *K. pneumoniae*) (**Tabela 2**).

Quando o biofilme dessas cepas foi exposto ao haloperidol, o resultado de CEMB variou de 64-512  $\mu\text{g/mL}$  para *A. baumannii* (GM = 128) e de 256 - >512  $\mu\text{g/mL}$  para *K. pneumoniae* (GM = 406,4). Não foram observados valores de CEMB de haloperidol para *P. aeruginosa* (**Tabela 2**).

**Tabela 2** – Concentrações eliminatórias mínimas do biofilme (CEMBs) para haloperidol, ciprofloxacina (CIP), meropenem (MER) e amicacina (AMK) isolado e associado contra *Pseudomonas aeruginosa* (n=6), *Acinetobacter baumannii* (n=6) e *Klebsiella pneumoniae* (n=6).

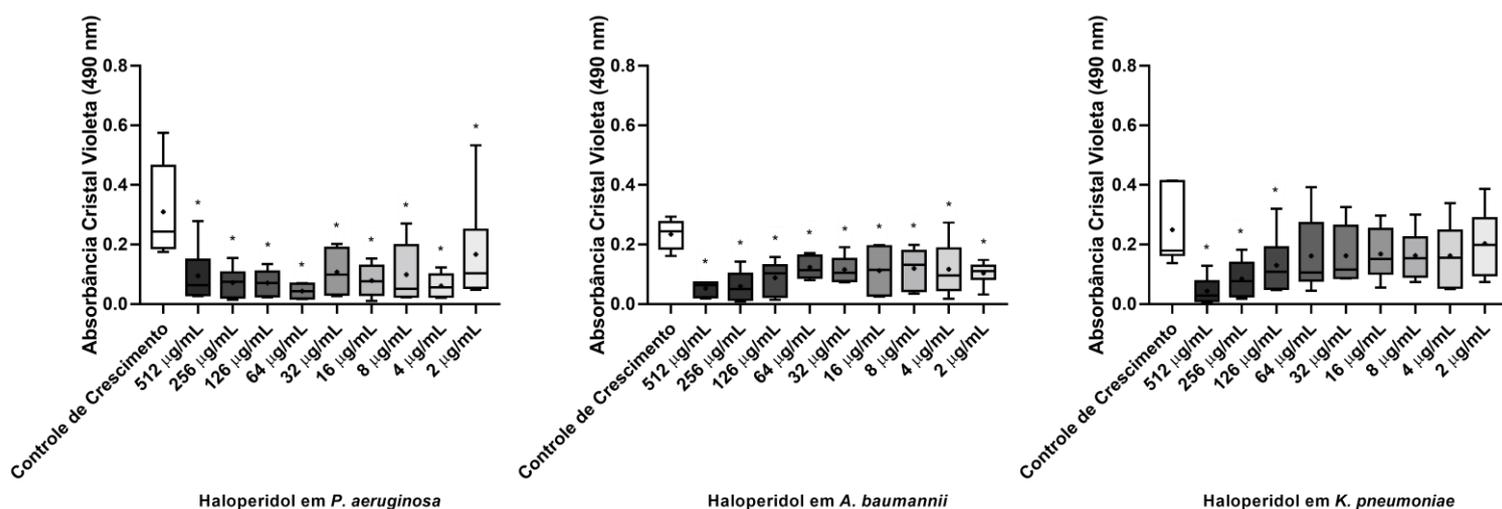
Cepas (GrAMM)	Formação do Biofilme	Haloperidol (µg/mL)		CIP (µg/mL)		MER (µg/mL)			AMK (µg/mL)		
		Isolado	Isolado	+Haloperidol (CEMB/2)	+Haloperidol (CEMB/4)	Isolado	+Haloperidol (CEMB/2)	+Haloperidol (CEMB/4)	Isolado	+Haloperidol (CEMB/2)	+Haloperidol (CEMB/4)
		CEMB	CEMB	CEMB	CEMB	CEMB	CEMB	CEMB	CEMB	CEMB	CEMB
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 01	Forte	>512	>256	128	128	>256	4	8	>256	8	32
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 02	Moderado	>512	256	64	64	>256	8	>256	>256	16	64
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 03	Moderado	>512	256	128	128	>256	>256	>256	>256	64	128
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 04	Forte	>512	>256	4	8	>256	4	8	>256	8	32
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 05	Fraco	>512	>256	4	8	>256	4	8	>256	8	16
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	Moderado	>512	>256	4	8	>256	4	8	128	8	8
<b>Geometric Mean</b>		<b>1024</b>	<b>406,4</b>	<b>20,2*</b>	<b>28,5*</b>	<b>512,0</b>	<b>10,1*</b>	<b>32,0</b>	<b>406,4</b>	<b>12,7*</b>	<b>32,0*</b>
<i>Acinetobacter baumannii</i> 01	Moderado	512	>256	8	8	128	16	64	>256	256	>256
<i>Acinetobacter baumannii</i> 02	Moderado	128	>256	16	32	64	16	32	>256	>256	>256
<i>Acinetobacter baumannii</i> 03	Moderado	128	256	64	>256	64	16	32	>256	64	>256
<i>Acinetobacter baumannii</i> 04	Moderado	64	>256	>256	>256	>256	>256	>256	>256	>256	>256
<i>Acinetobacter baumannii</i> 05	Moderado	64	>256	>256	>256	256	8	16	>256	>256	>256
<i>Acinetobacter baumannii</i> 06	Forte	128	>256	8	16	64	8	8	>256	16	32
<b>Geometric Mean</b>		<b>128</b>	<b>456,1</b>	<b>50,8</b>	<b>90,5</b>	<b>128,0</b>	<b>22,6*</b>	<b>40,3</b>	<b>512,0</b>	<b>181,0</b>	<b>322,5</b>
<i>Klebsiella pneumoniae</i> 01	Fraco	512	>256	>256	>256	>256	64	64	>256	>256	>256
<i>Klebsiella pneumoniae</i> 02	Fraco	256	256	128	128	>256	64	64	>256	>256	>256
<i>Klebsiella pneumoniae</i> 03	Fraco	256	>256	4	8	128	4	8	256	128	256
<i>Klebsiella pneumoniae</i> 04	Fraco	256	256	32	128	>256	8	8	>256	>256	>256
<i>Klebsiella pneumoniae</i> 05	Forte	512	>256	128	>256	>256	128	>256	>256	>256	>256
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 700603	Forte	>512	>256	>256	>256	>256	>256	>256	>256	128	>256
<b>Geometric Mean</b>		<b>406,4</b>	<b>406,4</b>	<b>90,5</b>	<b>161,3</b>	<b>406,4</b>	<b>45,3*</b>	<b>64,0</b>	<b>456,1</b>	<b>384,0</b>	<b>456,1</b>

\*Indica diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ) quando comparado o MIC da combinação com o MIC do antibacteriano isolado.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Em todas as concentrações testadas (2 – 512  $\mu\text{g/mL}$ ), o haloperidol foi capaz de reduzir a biomassa dos biofilmes dos não fermentadores ( $p < 0,05$ ) e nas concentrações de 128 – 512  $\mu\text{g/mL}$  reduziu a biomassa do biofilme de *K. pneumoniae* ( $p < 0,05$ ), quando comparado ao controle de crescimento dos biofilmes não expostos. Nas concentrações de 512, 256 e 128  $\mu\text{g/mL}$  de haloperidol, a redução média da biomassa do biofilme de *P. aeruginosa* foi de 73%, 77% e 77%, respectivamente. Para o biofilme de *A. baumannii*, foi de 78%, 76% e 65% e para o de *K. pneumoniae* a redução foi de 85%, 66% e 51%, respectivamente (**Figura 4**).

**Figura 4.** Efeito do haloperidol na biomassa em biofilmes maduros de *Pseudomonas aeruginosa* (n=6), *Acinetobacter baumannii* (n=6) e *Klebsiella pneumoniae* (n=6).



Os biofilmes maduros foram cultivados em caldo BHI-1% glucose, durante 48h, e depois expostos a diferentes concentrações (2 - 512  $\mu\text{g/mL}$ ) de haloperidol durante 24 h. Controle de crescimento: biofilmes que não foram expostos ao haloperidol. Dados expressos como média e desvio padrão da biomassa do biofilme, medida pela técnica de coloração com cristal violeta. \* indicam diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ), quando comparadas com o controle de crescimento de biofilme sem fármacos.

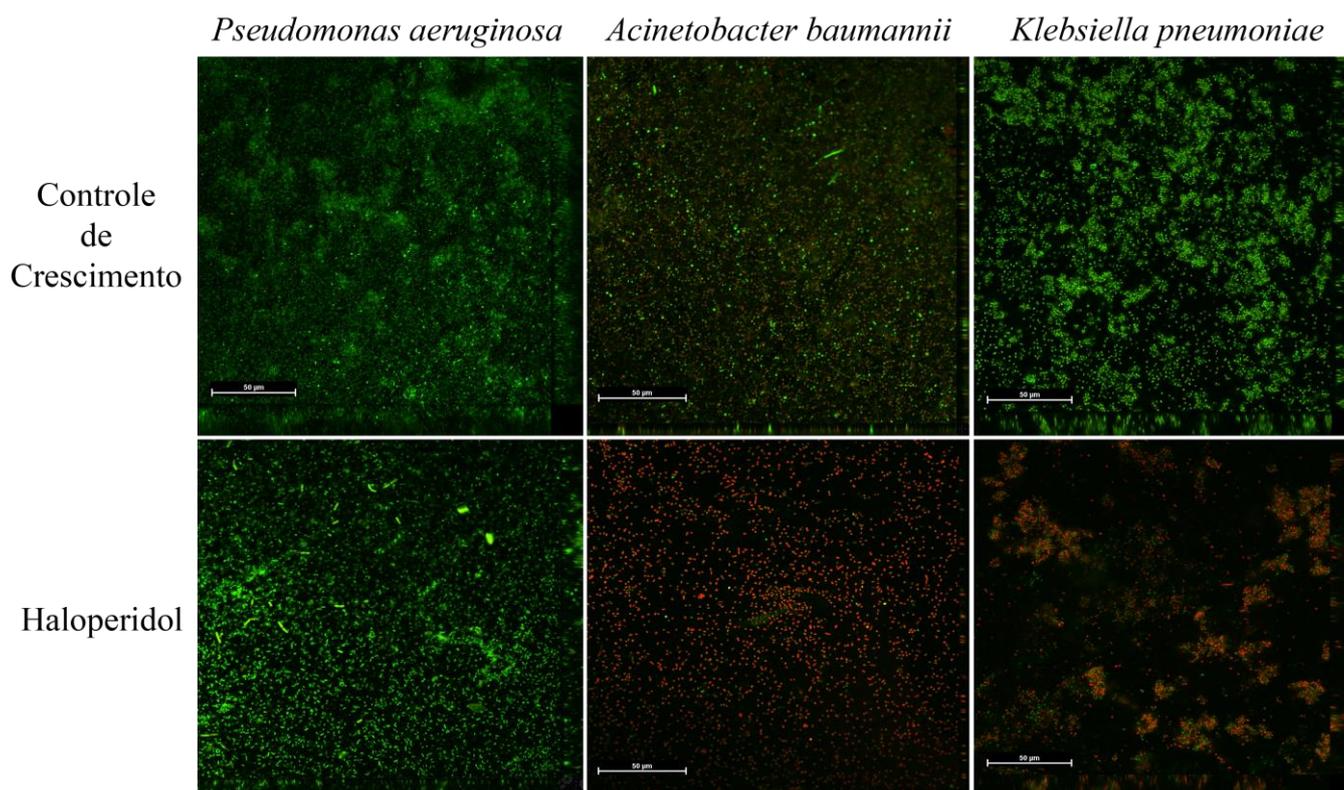
Fonte: Elaborada pelo autor.

Na análise dos parâmetros avaliados no confocal as concentrações CEMB do haloperidol testadas nas cepas de *A. baumannii* 06 e *K. pneumoniae* 05, 128 e 512  $\mu\text{g/mL}$  respectivamente demonstrou um rompimento da estrutura do biofilme, evidenciado pela redução significativa ( $p < 0,05$ ) da biomassa, espessura média da biomassa e espessura média de toda a área e aumento significativo ( $p < 0,05$ ) do coeficiente de rugosidade e relação superfície-volume (**Figuras 5 e 6**).

Em relação a cepa de *P. aeruginosa* utilizada para análise por microscopia confocal, a concentração de CEMB para o haloperidol não foi possível ser encontrada então

foi testada a maior concentração possível (1024 µg/mL). Apenas a espessura máxima apresentou uma redução significativa ( $p < 0,05$ ) (**Figura 6**).

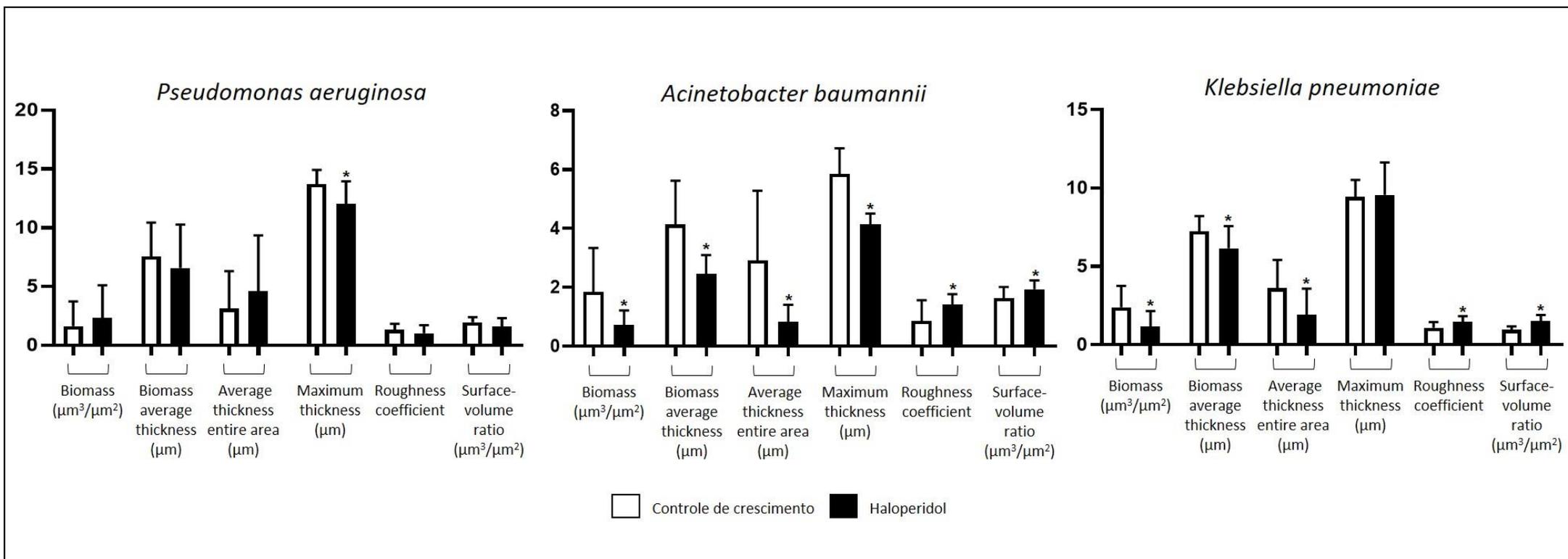
**Figura 5.** Imagens representativas de microscopia confocal de varrimento a laser dos biofilmes maduros de *P. aeruginosa*, *A. baumannii* e *K. pneumoniae* após exposição ao haloperidol.



Biofilmes maduros: os biofilmes das cepas *P. aeruginosa* 01, *A. baumannii* 06 e *K. pneumoniae* 05, que cresceram durante 48 horas, foram expostos ao haloperidol a concentração de CEMB e incubados durante mais 24 horas. Note-se a redução da biomassa e da espessura do biofilme em todas as espécies e o aumento do número de células mortas/danificadas somente em *A. baumannii* e *K. pneumoniae*. Os biofilmes não expostos ao haloperidol foram utilizados como controle de crescimento. As imagens foram obtidas utilizando um microscópio confocal Nikon C2 e o fluoróforo Live Dead™, a 488 nm para a detecção de SYTO9, que identifica as células bacterianas vivas (verde), e a 561 nm para a detecção de iodeto de propídio, que identifica as células bacterianas mortas/danificadas (vermelho). Ampliação 600X, Escala 50 mm

Fonte: Elaborada pelo autor.

**Figura 6.** Análise tridimensional de imagens Z-stack adquiridas por microscopia de varrimento a laser confocal de biofilmes maduros de *P. aeruginosa*, *A. baumannii* e *K. pneumoniae* após exposição ao haloperidol.



Biofilmes maduros: os biofilmes das cepas *P. aeruginosa* 01, *A. baumannii* 06 e *K. pneumoniae* 05, cultivados durante 48 h, foram expostos ao haloperidol a concentração de CEMB e incubados durante mais 24 h. O controle do crescimento do biofilme foi ainda incubado num meio sem haloperidol. As imagens foram adquiridas utilizando um microscópio confocal Nikon C2 e o fluoróforo Live Dead™ e as imagens Z-stack foram analisadas com o software COMSTAT™. \*( $p < 0,05$ ) indicam diferenças significativas entre os parâmetros do biofilme obtidos para os biofilmes expostos à haloperidol e o controle de crescimento do biofilme não exposto.

Fonte: Elaborada pelo autor.

### 6.3 Efeito do haloperidol na sensibilidade aos antimicrobianos em biofilmes maduros dos microrganismos em estudo

Com relação às drogas antibacterianas isoladas, para CIP, não foram encontrados valores de CEMB na maior concentração testada de 256 µg/mL frente a maioria das cepas das três espécies, exceto por duas cepas de *P. aeruginosa* e duas de *K. pneumoniae* que tiveram CEMB de 256 µg/mL. Não foram observados CEMBs contra *A. baumannii* (**Tabela 2**).

Para MER também não houve valores de CEMB frente ao biofilme de *P. aeruginosa*. Para *A. baumannii*, a CEMB do antibacteriano variou de 16-128 µg/mL e para *K. pneumoniae* foi determinada CEMB apenas contra uma cepa multirresistente (CEMB=128 µg/mL), todos os valores (**Tabela 2**).

Em relação a AMK, a CEMB foi determinada apenas para a uma cepa *P. aeruginosa* (CEMB= 128 µg/mL), duas cepas de *K. pneumoniae* multirresistentes (CEMB= 64 e 256 µg/mL). Não foram observados CEMBs contra *A. baumannii* (**Tabela 2**).

Na avaliação do efeito haloperidol na sensibilidade do biofilme aos antibacterianos, observou-se que houve uma redução das CEMB da CIP, MER e AMK contra o biofilme de todas as espécies com sigficancia estatística para todos os antimicrobianos em *P. aeruginosa*, e apenas em meropenem na concentração do haloperidol de CEMB/2 para as demais espécies (p<0,05) (**Tabela 2**).

## 7 DISCUSSÃO

Atualmente com a pandemia pelo COVID-19 intensificou ainda mais a problemática da resistência antimicrobiana onde foram diversos os fatores que levaram ao aumento de bactérias multirresistentes isoladas de infecções relacionadas à assistência à saúde dentre os fatores a administração de antimicrobianos a pacientes com COVID-19 e baixas taxas de infecção secundária associada (LAI *et al.*, 2021).

As espécies de maior importância nesse contexto de resistência aos antimicrobianos são principalmente *P. aeruginosa*, *A. baumannii* e *K. pneumoniae* de acordo com a Organização Mundial de Saúde (TACCONELLI *et al.* 2018; MANCUSO *et al.* 2021) devido aos diversos mecanismos de resistência que essas bactérias vêm expressando para sobreviver frente a utilização dos antimicrobianos. Isso faz com que novas alternativas terapêuticas sejam buscadas para tratar infecções causadas por esses microrganismos (WANG *et al.*, 2020a).

As principais infecções que essas bactérias estão relacionadas são principalmente pneumonia associadas à assistência à saúde, mas também podem estar associadas a outros tipos de infecções como urinária, corrente sanguínea e ferida (BOTELHO; GROSSO; PEIXE, 2019; QUEIROZ; MACIEL; SANTOS, 2022; WANG *et al.*, 2020b).

A vantagem do reposicionamento de fármacos se faz uma alternativa mais viável e menos onerosa em relação ao desenvolvimento e descobrimento de novos medicamentos pois já há a vantagem de remanejar medicamentos já aprovados pela *Food and Drugs Administration* (FDA) (LIU *et al.* 2021), inserido nesse cenário temos atualmente diversas pesquisas com reposicionamento de fármacos, principalmente psicotrópicos (ELLEZIAN *et al.*, 2022), dentre eles o haloperidol que é um antipsicótico de primeira geração usado para tratamento de esquizofrenia, síndrome de Tourette e distúrbios comportamentais (RAHMAN; MARWAHA, 2022), em que seu potencial antimicrobiano vem sendo estudado como inibidor de bomba de efluxo em microrganismos como bactérias e fungos (LAWLER *et al.*, 2013; BRILHANTE *et al.*, 2016; ANEKE *et al.*, 2020; EI-GANINY *et al.*, 2022).

Os CIMs de haloperidol encontrados para as espécies estudadas variaram de 64 a 512 µg/mL semelhante a estudos que também testaram o haloperidol em *M. tuberculosis* com CIM de 32 a 64 µg/mL (MACHADO *et al.* 2016), em *Candida* 80 µg/mL (BRILHANTE *et al.*, 2016), 64 a >256 µg/mL (JI *et al.*, 2020), 64 µg/mL (EI-GANINY *et al.*, 2022), em *Cryptococcus neoformans* 32 a 64 µg/mL (JI *et al.*, 2020) e em *Microsporium canis* 400 a 800 µg/mL (ANEKE *et al.*, 2020) mostrando uma faixa semelhante entre as CIMs.

A análise por *docking molecular* feita por El-Ganiny e colaboradores (2022) demonstrou a interação entre a molécula do haloperidol com as proteínas de bomba *CDRI*, *MDR1* e *ABC2* em *Candida*, além disso seu trabalho também demonstra a inibição da expressão gênica da bomba de efluxo e redução da CIM em *Candida*. Estudos que demonstraram a atividade antimicrobiana de compostos derivados do haloperidol o referenciam como um inibidor de bomba de efluxo e utilizaram análise de expressão de genes da bomba de efluxo em *Candida* e *Cryptococcus* para confirmar a redução da expressão das bombas de efluxo nessas espécies após tratadas com os compostos derivados do haloperidol (JI *et al.*, 2020).

Em relação aos resultados obtidos na associação do haloperidol com os antimicrobianos na forma planctônica e de biofilme das cepas, o haloperidol pareceu ter reduzido os CIMs mas somente com significância estatística ( $p < 0,05$ ) em *A. baumannii* em amicacina associada com haloperidol na concentração subinibitória de CIM/2. Trabalhos diversos trazendo o haloperidol como inibidor de bomba de efluxo mostraram o potencial sinérgico do haloperidol quando associado a antifúngicos e testado em fungos, sendo escassos os trabalhos que trazem associação entre antibacterianos testados em bactérias (LAWLER *et al.*, 2013; MACHADO *et al.*, 2016; BRILHANTE *et al.*, 2016; ANEKE *et al.*, 2020; JI *et al.*, 2020; EL-GANINY *et al.*, 2022).

Somente em um trabalho de Nehme e colaboradores (2018) foi testado o haloperidol contra algumas bactérias Gram positivas e negativas como *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *A. baumannii*, *E. coli*, *K. pneumoniae*, cepas ATCC e clínicas, mas não encontrou CIM para nenhuma sendo maior que a maior concentração testada de 1024  $\mu\text{g/mL}$ .

Os valores de CEMB do haloperidol nos microrganismos variaram entre 64 - 512 e 256 -  $>512$  para *A. baumannii* e *K. pneumoniae* respectivamente enquanto para *P. aeruginosa* não foram encontrados valores de CEMB mostrando um aumento da resistência esperado em relação aos valores de CIM pelo biofilme ser uma forma mais resistente da bactéria que impede a ação dos antimicrobianos (HEMMATI *et al.*, 2021).

Houve uma diminuição acentuada da biomassa do biofilme quando tratado com haloperidol, principalmente com as bactérias Gram-negativas não fermentadoras tendo uma diminuição de 65 a 78%, enquanto que para a *K. pneumoniae* foi de 51% a 85%. Esse resultado pode estar associado ao perfil de formação de biofilme das cepas em que as cepas de *K. pneumoniae* são em sua maioria fracas formadoras enquanto as cepas de *P. aeruginosa* e *A. baumannii* são de intermediárias a forte formadoras, além disso a capacidade do haloperidol de reduzir o biofilme se dá pela capacidade desse antipsicótico se comportar como

uma piperidina que é um composto orgânico que funciona como agente dispersante do biofilme produzido pelas bactérias (ALLEN *et al.*, 2016).

A redução dos CEMBs observada em todas as espécies desse estudo, após a associação do haloperidol com os antimicrobianos no biofilme maduro, possivelmente se dá devido ao potencial que esse antipsicótico tem como dispersor de biofilme quebrando a matriz polimérica produzida facilitando a ação do antimicrobiano (ALLEN *et al.*, 2018; RANG *et al.*, 2020; ATRIWAL *et al.*, 2021), isso pode ser comprovado nos resultados obtidos pela microscopia confocal, onde observamos uma alteração dos parâmetros de forma significativa ( $p < 0,05$ ) principalmente nos biofilmes de *A. baumannii* e *K. pneumoniae* enquanto em *P. aeruginosa* somente o parâmetro de espessura máxima houve uma alteração significativa pois a concentração de CEMB não foi encontrada então foi utilizada a maior concentração possível.

Pensando na redução do biofilme observado principalmente nos Gram-negativos não fermentadores pode-se teorizar a junção entre a capacidade de dispersão do biofilme (ALLEN *et al.*, 2018) e inibição de bomba de efluxo (LAWLER *et al.*, 2013; BRILHANTE *et al.*, 2016; ANEKE *et al.*, 2020; El-GANINY *et al.*, 2022) atuando nessas duas espécies por serem maiores formadores de biofilme e expressores de bomba de efluxo em comparação com *K. pneumoniae* (WANG *et al.*, 2020b).

Bactérias Gram-negativas como *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii* e *Klebsiella pneumoniae* são conhecidas por expressar e produzir enzimas, como carbapenemases, penicilinases, enzimas modificadoras de aminoglicosídeos (AMEs) que inativam os antibióticos tornando-as resistentes a diversos antibióticos entre eles os fluorquinolonas, carbapenemicos e aminoglicosídeos são importantes no tratamento de infecções causadas por esses microrganismos (NORDMANN, POIREL, 2019).

Levando em consideração a diminuição das CIMs observadas principalmente do haloperidol associado a amicacina em *A. baumannii* podemos pensar no potencial inibidor de enzimas modificadoras de aminoglicosídeos que o haloperidol pode ter, em um trabalho de liu, ling e zhou (2015), eles observaram a expressão de genes que codificam AMEs presentes em cepas clínicas de *A. baumannii* em Sishuan, China.

Chan e colaboradores (2005) demonstraram que o processo controlado pelo quorum sensing como a formação de biofilme é dependente da bomba de efluxo BpeABOprB em *Burkholderia pseudomallei*. Em *Pseudomonas aeruginosa*, foi observado que a mutação num transportador da família RND regulou negativamente o biofilme (DIGGLE *et al.*, 2002). Por conseguinte, um aumento na atividade da bomba de efluxo pode ter diversos efeitos na formação de biofilme através de um aumento da expulsão ou intrusão de moléculas do

quorum sensing (HOCQUET et al., 2007).

A expressão de bombas de efluxo em uma espécie bacteriana está diretamente ligada principalmente na fase de adesão e estabelecimento do biofilme segundo Hajiagha e Kafil (2023) existem algumas bombas como a *MexEF-OprN* e *AdeABC*, que podem estar presentes em *P. aeruginosa* e *A. baumannii* respectivamente. que facilitam o processo de adesão e podem estar regulando a entrada e saída de substâncias químicas da matriz formada para dentro da célula bacteriana e a inibição dessas bombas pode impactar diretamente no biofilme dessas bactérias e pode até ajudar na ação da terapia antimicrobiana.

## 8 CONCLUSÃO

O haloperidol apresenta efeito antimicrobiano contra *P. aeruginosa*, *A. baumannii* e *K. pneumoniae* em suas formas planctônica e em biofilme exceto em *P. aeruginosa* que não foi houve CEMB;

O haloperidol reduz a biomassa e é capaz de desestruturar o biofilme maduro de *P. aeruginosa*, *A. baumannii* e *K. pneumoniae*;

As associações do haloperidol com os antimicrobianos geraram reduções nas CEMBs, especialmente para meropenem;

Mais estudos são necessários a fim de melhor caracterizar os mecanismos de ação antimicrobiana que o haloperidol possui principalmente nas bactérias Gram-negativas.

## 9 PERSPECTIVAS

Os mecanismos de ação do haloperidol como antimicrobiano ainda são pouco caracterizados principalmente em bactérias Gram-negativas, estudos para entender como esse fármaco age nos diferentes mecanismos de resistência dessas bactérias são essenciais para sanar dúvidas acerca dos resultados observados.

Quanto ao efeito de inibição em bomba de efluxo do haloperidol, são necessárias mais análises, afim de caracterizar quais bombas nas diferentes espécies o fármaco é capaz de inibir, para ser possível uma melhor discussão entre os resultados de associação do haloperidol com os antimicrobianos. Análises de expressão gênica, avaliação de dano em membrana e computacionais como *docking molecular* podem ser uma ferramenta importante para auxiliar nos testes.

## REFERÊNCIAS

- AIT CHAIT, Yasmina et al. Unravelling the antimicrobial action of antidepressants on gut commensal microbes. **Scientific reports**, v. 10, n. 1, p. 17878, 2020.
- ANVISA. AGENCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. NOTA TÉCNICA GVIMS/GGTES/DIRE3/ANVISA nº 01/2023 - **Orientações para vigilância das Infecções Relacionadas à assistência à Saúde (IRAS) e resistência microbiana (RM) em serviços de saúde**, de 11 de janeiro de 2009. Disponível em:< [www.anvisa.gov.br/legis](http://www.anvisa.gov.br/legis)> Acessado em: 15 jun. 2023.
- ALLEN, H. B. Alzheimer's disease: assessing the role of spirochetes, biofilms, the immune system, and amyloid- $\beta$  with regard to potential treatment and prevention. **Journal of Alzheimer's Disease**, v. 53, n. 4, p. 1271-1276, 2016.
- ALLEN, H. B. *et al.* Alzheimer's disease: Possible mechanisms for worsening of the disease. **Curr Neurobiol**, v. 9, p. 59-65, 2018.
- ALMASAUDI, S. B. Acinetobacter spp. as nosocomial pathogens: Epidemiology and resistance features. **Saudi journal of biological sciences**, v. 25, n. 3, p. 586-596, 2018.
- ANEKE, C. I. *et al.* Synergistic effects of efflux pump modulators on the azole antifungal susceptibility of *Microsporum canis*. **Mycopathologia**, v. 185, n. 2, p. 279-288, 2020.
- ARCIOLA, C. R. *et al.* Biofilm formation in Staphylococcus implant infections. A review of molecular mechanisms and implications for biofilm-resistant materials. **Biomaterials**, v. 33, n. 26, p. 5967-5982, 2012.
- ATRIWAL, T. *et al.* Mechanistic understanding of *Candida albicans* biofilm formation and approaches for its inhibition. **Frontiers in Microbiology**, v. 12, p. 638609, 2021.
- BEACH, S. R. *et al.* Intravenous haloperidol: A systematic review of side effects and recommendations for clinical use. **General Hospital Psychiatry**, v. 67, p. 42-50, 2020.
- BONYADI, P. *et al.* Prevalence of antibiotic resistance of *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis infection: a systematic review and meta-analysis. **Microbial Pathogenesis**, v. 165, p. 105461, abr. 2022.
- BOTELHO, J.; GROSSO, F.; PEIXE, L. Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*—Mechanisms, epidemiology and evolution. **Drug Resistance Updates**, v. 44, p. 100640, 2019.
- BRILHANTE, R. S. N. *et al.* Azole resistance in *Candida* spp. isolated from Catú Lake, Ceará, Brazil: an efflux-pump-mediated mechanism. **brazilian journal of microbiology**, v. 47, p. 33-38, 2016.
- CDC. **Antibiotic Resistance Threats in the United States, 2019**. Atlanta, GA: U.S.

- Department of Health and Human Services, CDC; 2019.
- CIOFU, O. *et al.* Tolerance and resistance of microbial biofilms. **Nature Reviews Microbiology**, v. 20, n. 10, p. 621-635, 2022.
- CHAN, Y. Y.; CHUA, K. L. The Burkholderia pseudomallei BpeAB-OprB efflux pump: expression and impact on quorum sensing and virulence. **Journal of bacteriology**, v. 187, n. 14, p. 4707-4719, 2005.
- CLSI. 2021. **Performance standards for antimicrobial susceptibility testing**, M100, 31st ed. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.
- COSTA, M. *et al.* Principais micro-organismos responsáveis por infecções relacionadas à assistência em saúde (iras) em UTIs: uma revisão integrativa. **Revista Eletrônica da Faculdade Evangélica de Ceres**, v. 8, n. 1, p. 30-30, 2019.
- DALMASIO, S. M. R. **Aspectos epidemiológicos da espécie Acinetobacter baumannii no controle de infecções relacionadas à assistência à saúde: uma revisão da literatura**. 2018. 38 f. Trabalho de conclusão (Especialização em Microbiologia) – Departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2018.
- DE OLIVEIRA SANTOS, J. V. *et al.* Panorama of bacterial infections caused by epidemic resistant strains. **Current Microbiology**, v. 79, n. 6, p. 175, 2022.
- DE SOUSA, A. K. *et al.* New roles of fluoxetine in pharmacology: Antibacterial effect and modulation of antibiotic activity. **Microbial pathogenesis**, v. 123, p. 368-371, 2018.
- DIGGLE, S. P. *et al.* Advancing the quorum in Pseudomonas aeruginosa: MvaT and the regulation of N-acylhomoserine lactone production and virulence gene expression. **Journal of Bacteriology**, v. 184, n. 10, p. 2576-2586, 2002.
- DIGGLE, S. P.; WHITELEY, M. Microbe Profile: Pseudomonas aeruginosa: opportunistic pathogen and lab rat. **Microbiology**, v. 166, n. 1, p. 30, 2020.
- DIJKSHOORN, L.; NEMEC, A. The diversity of the genus Acinetobacter. **Acinetobacter molecular microbiology**, p. 1-34, 2008.
- DOUGHARI, H. J. *et al.* The ecology, biology and pathogenesis of Acinetobacter spp.: an overview. **Microbes and environments**, v. 26, n. 2, p. 101-112, 2011.
- ELLEZIAN, L. *et al.* Psychotropic Drugs in the Discussion of Antimicrobial-Resistant Microorganisms. **Dna And Cell Biology**, [S.L.], v. 41, n. 11, p. 919-923, 1 nov. 2022.
- EL-GANINY, A. M. *et al.* Repurposing pantoprazole and haloperidol as efflux pump inhibitors in azole resistant clinical Candida albicans and non-albicans isolates. **Saudi Pharmaceutical Journal**, v. 30, n. 3, p. 245-255, 2022.

- EXTREMINA, C. I. *et al.* Optimization of processing conditions for the quantification of enterococci biofilms using microtitre-plates. **Journal of Microbiological Methods**, v. 84, n. 2, p. 167-173, 2011.
- FROST, I. *et al.* The role of bacterial vaccines in the fight against antimicrobial resistance: an analysis of the preclinical and clinical development pipeline. **The Lancet Microbe**, v. 4, n. 2, p. 113-125, fev. 2023.
- GARNACHO-MONTERO, J.; AMAYA-VILLAR, R. El problema de la multi-resistencia en bacilos gram-negativos en las unidades de cuidados intensivos: estrategias de tratamiento y prevención. **Medicina Intensiva**, v. 46, n. 6, p. 326-335, jun. 2022.
- HALOPERIDOL: Solução Injetável. [BULA]. São Paulo: Fresenius Kabi, 2023. Disponível em: <[https://www.fresenius-kabi.com/br/documents/Haloperidol\\_PS.pdf](https://www.fresenius-kabi.com/br/documents/Haloperidol_PS.pdf)>. Acesso em: 11 jun. 2023.
- HEMMATI, F. *et al.* Novel strategies to combat bacterial biofilms. **Molecular biotechnology**, v. 63, n. 7, p. 569-586, 2021.
- HILLIAM, Y.; KAYE, S.; WINSTANLEY, C. *Pseudomonas aeruginosa* and microbial keratitis. **Journal of Medical Microbiology**, v. 69, n. 1, 2020.
- HOLBROOK, S. Y. L. *et al.* Repurposing antipsychotic drugs into antifungal agents: Synergistic combinations of azoles and bromperidol derivatives in the treatment of various fungal infections. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 139, p. 12-21, 2017.
- HORCAJADA, J. P. *et al.* Epidemiology and Treatment of Multidrug-Resistant and Extensively Drug-Resistant *Pseudomonas aeruginosa* Infections. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 32, n. 4, 18 set. 2019.
- HUANG, R. *et al.* Tox21Challenge to build predictive models of nuclear receptor and stress response pathways as mediated by exposure to environmental chemicals and drugs. **Frontiers in Environmental Science**, v. 3, p. 85, 2016.
- HUEMER, M. *et al.* Antibiotic resistance and persistence—Implications for human health and treatment perspectives. **EMBO reports**, v. 21, n. 12, p. e51034, 2020.
- IBRAHIM, S. *et al.* Multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* as an emerging concern in hospitals. **Molecular biology reports**, v. 48, n. 10, p. 6987-6998, 2021.
- ISLER, B. *et al.* New treatment options against carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* infections. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 63, n. 1, p. e01110-18, 2019.
- JARA, M. C. *et al.* Multidrug-Resistant Hospital Bacteria: Epidemiological Factors and Susceptibility Profile. **Microbial Drug Resistance**, v. 27, n. 3, p. 433-440, 1 mar. 2021.

- JI, C. *et al.* Drug repurposing of haloperidol: discovery of new benzocyclane derivatives as potent antifungal agents against cryptococcosis and candidiasis. **ACS infectious diseases**, v. 6, n. 5, p. 768-786, 2020.
- JUNG, J.; PARK, W. Acinetobacter species as model microorganisms in environmental microbiology: current state and perspectives. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 99, p. 2533-2548, 2015.
- KANAFANI, A. Z.; KANJ, S. S. **Ministry of Health**, Kingdome of Saudi Arabia. 2014.
- KERN, W. V.; RIEG, S. Burden of bacterial bloodstream infection—a brief update on epidemiology and significance of multidrug-resistant pathogens. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 26, n. 2, p. 151-157, 2020.
- KISHI, T. *et al.* Efficacy and safety of antipsychotic treatments for schizophrenia: A systematic review and network meta-analysis of randomized trials in Japan. **Journal of Psychiatric Research**, v. 138, p. 444-452, 2021.
- K BHARDWAJ, A.; MOHANTY, P. Bacterial efflux pumps involved in multidrug resistance and their inhibitors: rejuvenating the antimicrobial chemotherapy. **Recent patents on anti-infective drug discovery**, v. 7, n. 1, p. 73-89, 2012.
- LAI, C. C. *et al.* Increased antimicrobial resistance during the COVID-19 pandemic. **International journal of antimicrobial agents**, v. 57, n. 4, p. 106324, 2021.
- LANGENDONK, R. F.; NEILL, D. R.; FOTHERGILL, J. L. The Building Blocks of Antimicrobial Resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: implications for current resistance-breaking therapies. **Frontiers In Cellular and Infection Microbiology**, v. 11, 16 abr. 2021.
- LAWLER, A. J. *et al.* Genetic inactivation of *acrAB* or inhibition of efflux induces expression of *ramA*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 68, n. 7, p. 1551-1557, 2013.
- LIMA, W. G.; RAMOS-ALVES, M. C.; SOARES, A. C. Dos distúrbios psiquiátricos à antibioticoterapia: reposicionamento da clorpromazina como agente antibacteriano. **Revista Colombiana de Ciencias Químico-Farmacéuticas**, v. 48, n. 1, p. 5-28, 2019.
- LIU, Y. *et al.* Drug repurposing for next-generation combination therapies against multidrug-resistant bacteria. **Theranostics**, v. 11, n. 10, p. 4910-4928, 2021.
- LIU, Z.; LING, B.; ZHOU, L. Prevalence of 16S rRNA methylase, modifying enzyme, and extended-spectrum beta-lactamase genes among *Acinetobacter baumannii* isolates. **Journal of Chemotherapy**, v. 27, n. 4, p. 207-212, 2015.
- LONGO, L. G. A. *et al.* Colistin resistance emerges in pandrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* epidemic clones in Rio de Janeiro, Brazil. **International journal of antimicrobial agents**, v. 54, n. 5, p. 579-586, 2019.

- MACHADO, D. *et al.* Ion channel blockers as antimicrobial agents, efflux inhibitors, and enhancers of macrophage killing activity against drug resistant *Mycobacterium tuberculosis*. **PloS one**, v. 11, n. 2, p. e0149326, 2016.
- MANCUSO, G. *et al.* Bacterial antibiotic resistance: The most critical pathogens. **Pathogens**, v. 10, n. 10, p. 1310, 2021.
- MORADALI, M. F.; GHODS, S.; REHM, B. H. A. *Pseudomonas aeruginosa* Lifestyle: a paradigm for adaptation, survival, and persistence. **Frontiers In Cellular And Infection Microbiology**, v. 7, p. 1-1, 15 fev. 2017.
- MORAES, D.C.; FERREIRA-PEREIRA, A. Insights on the anticandidal activity of non-antifungal drugs. **Journal de Mycologie Médicale**, [S.L.], v. 29, n. 3, p. 253-259, set. 2019.
- MUNITA, J. M.; ARIAS, C. A. Mechanisms of Antibiotic Resistance. **Virulence Mechanisms Of Bacterial Pathogens**, p. 481-511, 9 abr. 2016.
- MURRAY, C. J. *et al.* Global Burden of Bacterial Antimicrobial Resistance in 2019: A Systematic Analysis. **The Lancet**, v. 399, n. 10325, p. 629–655, 19 jan. 2022.
- NEHME, H. *et al.* 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**, [S.L.], v. 13, n. 1, 3 jan. 2018.
- NORDMANN, P.; POIREL, L. Epidemiology and diagnostics of carbapenem resistance in gram-negative bacteria. **Clinical Infectious Diseases**, v. 69, n. Supplement\_7, p. S521-S528, 2019.
- NOURBAKHSI, F. *et al.* Bacterial biofilms and their resistance mechanisms: A brief look at treatment with natural agents. **Folia Microbiologica**, v. 67, n. 4, p. 535-554, 2022.
- NOWAK, P.; PALUCHOWSKA, P. *Acinetobacter baumannii*: biology and drug resistance role of carbapenemases. **Folia histochemica et cytobiologica**, v. 54, n. 2, p. 61-74, 2016.
- OSTINELLI, E. G. *et al.* Haloperidol for psychosis-induced aggression or agitation (rapid tranquillisation). **Cochrane database of systematic reviews**, n. 7, 2017.
- PAVÃO, D. P. *et al.* Capacidade de formação de biofilme por cepas bacterianas e ação antibiofilme do extrato de *Lafoensia pacari* (Lythraceae). **Revista Fitos**, v. 15, n. 2, 2021.
- PAZ-ZARZA, V. M. *et al.* *Pseudomonas aeruginosa*: patogenicidad y resistencia antimicrobiana en la infección urinaria. **Revista Chilena de Infectología**, v. 36, n. 2, p. 180-189, abr. 2019.
- PELEG, A. Y.; SEIFERT, H.; PATERSON, D. L. *Acinetobacter baumannii*: emergence of a successful pathogen. **Clinical microbiology reviews**, v. 21, n. 3, p. 538-582, 2008.
- QUEIROZ, Y. M.; MACIEL, I. A.; SANTOS, F. S. Mecanismo de resistência da bactéria

- Acinetobacter Baumannii e suas implicações no controle das infecções hospitalares. **Rev. bras. anal. clin;** **54 (1), 2022**, p. 37-43, 2022.
- RÁCZ, B.; SPENGLER, G. Repurposing Antidepressants and Phenothiazine Antipsychotics as Efflux Pump Inhibitors in Cancer and Infectious Diseases. **Antibiotics**, v. 12, n. 1, p. 137, 2023.
- RAHMAN, S.; MARWAHA, R. Haloperidol. In: **StatPearls [Internet]**. StatPearls Publishing, 2022.
- RANG, H. P. *et al.* Rang & Dale: **Farmacologia**. 9. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2020.
- RODRIGUES, D. *et al.* Amikacin for the treatment of carbapenem-resistant Klebsiella pneumoniae infections: clinical efficacy and toxicity. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 52, n. 4, p. 1913-1919, 2021.
- RÖMLING, U.; BALSALOBRE, C. Biofilm infections, their resilience to therapy and innovative treatment strategies. **Journal Of Internal Medicine**, v. 272, n. 6, p. 541-561, 29 out. 2012.
- SCHEIN, C. H. Repurposing approved drugs on the pathway to novel therapies. **Medicinal Research Reviews**, v. 40, n. 2, p. 586-605, mar. 2020.
- SHEN, Y. *et al.* Effects of haloperidol on delirium in adult patients: a systematic review and meta-analysis. **Medical Principles and Practice**, v. 27, p. 250-259, 2018.
- SIDRIM, J.J.C. *et al.* Chlorpromazine-impregnated catheters as a potential strategy to control biofilm-associated urinary tract infections. **Future microbiology**, v. 14, n.12, p. 1023–1034, 2019.
- SIDRIM, J. J. C. *et al.* Rhamnolipid enhances Burkholderia pseudomallei biofilm susceptibility, disassembly and production of virulence factors. **Future Microbiology**, v. 15, n. 12, p. 1109-1121, 2020.
- SILVA, G. C. **Estratégias em reposicionamento de fármacos**. Trabalho de Conclusão de Curso, Faculdade de Farmácia, Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, p.76, 2015.
- STEPANOVIC, S. *et al.* 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, 2007.
- TACCONELLI, E. *et al.* Discovery, research, and development of new antibiotics: the WHO priority list of antibiotic-resistant bacteria and tuberculosis. **The Lancet infectious diseases**, v. 18, n. 3, p. 318-327, 2018.
- THI, M. T. T.; WIBOWO, D.; REHM, B. H. A. *Pseudomonas aeruginosa*

- Biofilms. **International Journal Of Molecular Sciences**, v. 21, n. 22, p. 8671, 17 nov. 2020.
- TUON, F. F. *et al.* Pathogenesis of the *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm: a review. **Pathogens**, v. 11, n. 3, p. 300, 27 fev. 2022.
- URZEDO, J. E., *et al.* High mortality by nosocomial infections caused by carbapenem-resistant *P. aeruginosa* in a referral hospital in Brazil: facing the perfect storm. **Journal Of Medical Microbiology**, v. 69, n. 12, p. 1388-1397, 1 dez. 2020.
- VIEIRA, P. B.; PICOLI, S. U. Acinetobacter baumannii multirresistente: aspectos clínicos e epidemiológicos. **R bras ci Saúde**, v. 19, n. 2, p. 151-156, 2015.
- VIVAS, R. *et al.* Prevalence of Klebsiella pneumoniae carbapenemase-and New Delhi metallo-beta-lactamase-positive K. pneumoniae in Sergipe, Brazil, and combination therapy as a potential treatment option. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 53, 2020.
- WANG, C. H. *et al.* Defeating antibiotic-resistant bacteria: exploring alternative therapies for a post-antibiotic era. **International journal of molecular sciences**, v. 21, n. 3, p. 1061, 2020a.
- WANG, G. *et al.* The characteristic of virulence, biofilm and antibiotic resistance of Klebsiella pneumoniae. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 17, n. 17, p. 6278, 2020b.
- WANG, Y. *et al.* Antimicrobial Activity of Sertraline on Listeria monocytogenes. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 24, n. 5, p. 4678, 2023.
- Threats to Global Health in 2018. **WHO**, 2018. Disponível em: <<https://medium.com/@who/10-threats-to-global-health-in-2018-232daf0bbef32018>>. Acesso em: 10, março e 2023.
- WILSON, M G; PANDEY, S. Pseudomonas aeruginosa. **Statpearls Publishing**, Treasure Island, 28 ago. 2022.
- WYRES, K. L.; LAM, M. M. C.; HOLT, K. E. Population genomics of Klebsiella pneumoniae. **Nature Reviews Microbiology**, v. 18, n. 6, p. 344–359, 13 fev. 2020.