



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

FRANCISCO IVANILSON FIRMIANO GOMES

**EFEITO DA PROMETAZINA IMPREGNADA EM CATETER VESICAL DE
DEMORA SOBRE BIOFILMES DE BACIOS GRAM NEGATIVOS ASSOCIADOS
À INFECÇÃO DO TRATO URINÁRIO**

FORTALEZA-CE

2023

FRANCISCO IVANILSOM FIRMIANO GOMES

**EFEITO DA PROMETAZINA IMPREGNADA EM CATETER VESICAL DE
DEMORA SOBRE BIOFILMES DE BACIOS GRAM NEGATIVOS ASSOCIADOS
À INFECÇÃO DO TRATO URINÁRIO**

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 Médica.

Orientador^a: Prof^a. Dr^a. 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)

- G614e Gomes, Francisco Ivanilson Firmiano.
Efeito da prometazina impregnada em cateter vesical de demora sobre biofilmes de bacilos Gram negativos associados à infecção do trato urinário / Francisco Ivanilson Firmiano Gomes. – 2023.
63 f. : il. color.
- Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Médica, Fortaleza, 2023.
Orientação: Profa. Dra. Debora Castelo Branco de Souza Collares Maia.
Coorientação: Prof. Dr. Glaucia Morgana de Melo Guedes.
1. Infecções urinárias. 2. Cateter de demora. 3. Biofilme. 4. Impregnação. 5. Prometazina. I. Título.
CDD 616.9
-

FRANCISCO IVANILSOM FIRMIANO GOMES

Efeito da prometazina impregnada em cateter vesical de demora sobre biofilmes de bacilos Gram negativos associados à infecção do trato urinário

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 Médica.

Aprovada em: ___/___/_____

BANCA EXAMINADORA

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

Prof^ª. Dr^ª. Rhanna Emanuela Fontenele Lima de Carvalho
Universidade Estadual do Ceará (UECE)

Prof^ª. Dr^ª. Francisca Elisângela Teixeira Lima
Universidade Federal do Ceará (UFC)

A Deus.

Aos meus pais, Alzirene e Cesanildo.

Aos meus irmãos, Iranildo, Tânia e Tanmires

Aos meus familiares e amigos.

AGRADECIMENTOS

A Deus, que me fortalece e me dá forças para continuar mesmo nos momentos mais difíceis.

À professora Débora Castelo Branco, por ter me acolhido no laboratório de bacteriologia no meu terceiro semestre, totalmente imaturo, mas que de alguma forma, viu potencial em mim. Por me orientar na minha trajetória acadêmica e ser esse exemplo de professor que quero ser.

À professora Glaucia Guedes, pelas orientações e ajuda inestimável ao trabalho.

Às professoras que compõem a banca, Rhanna Emanuela Fontenele e Elisângela Teixeira pelo exemplo de enfermeiras fortes e destaque na área da enfermagem que é tão ampla. Obrigado também pelas considerações sobre o trabalho e valiosas colaborações e sugestões.

Ao meus pais, Alzirene e Cesanildo, pelo amor incondicional, que compartilharam esse sonho e que sempre fizeram o possível e o impossível para que eu pudesse realiza-lo. Que confiaram e deixaram um menino de 17 anos sair de um distrito no interior do estado em busca da realização de um sonho que até hoje está se concretizando. Tenho orgulho de ser filho de vocês e fico honrado em levar essa alegria para a nossa família.

Aos meus irmãos, Iranildo, Tânia e Tanmires, que mantiveram todo carinho e cuidado mesmo estando longe. Obrigado por sempre me apoiarem, por estarem sempre disponíveis, pelas broncas, pelos ensinamentos, pelos momentos de gargalhadas e por dividirem tanto amor comigo.

À madrinha Catarina, Socorro e madrinha Conceição, por todo carinho e afeto maternal, que sempre estão me incentivando e acreditando em mim.

Ao Rodrigo Guedes, por me apoiar em tudo e torcer sempre pelo meu melhor, pelos momentos de cumplicidade e por todo amor que sempre me oferece.

Aos meus amigos de laboratório Paulo, Vinicius, Carliane, Jaiane, Alyne, Ana Carla e Expedito por compartilharem e estarem dividindo experiências nessa rotina laboratorial. Em especial ao Bruno Amando, que foi um dos maiores presentes que o laboratório de bacteriologia poderia me dar. Obrigado por todos os ensinamentos, por confiar e por proporcionar momentos tão leves. Todos os conhecimentos e técnicas de bancada que adquiri. tem um toque seu no meio.

Às minhas amigas que a graduação me deu, Amanda, Deyse, Glaubervania, Idarlana, Lívia, Letícia, Samantha e Thaís, que me ensinaram o valor da amizade, que compartilharam momentos de muita alegria e que foram a âncora nos meus momentos difíceis. Tenho orgulho de tê-las como amigas e também da profissional incrível que cada uma é.

À Tamires, Jessyka, Rogério, Manu, Júnior e Morgana, que são meus amigos de coração, obrigado pelo companheirismo, pelos momentos incríveis que vivemos juntos.

RESUMO

A infecção do trato urinário é uma das principais infecções relacionadas à assistência à saúde, principalmente quando se trata do uso de dispositivos médicos invasivos. Cateteres vesicais de demora são corpos estranhos que são inseridos na uretra e se tornam suscetíveis à colonização bacteriana e o desenvolvimento de biofilmes. Os biofilmes conferem maior proteção e resistência bacteriana. As bombas de efluxo são importantes meios de evasão bacteriana da ação de antimicrobianos e participam dos processos de formação e de manutenção de biofilmes bacterianos, podendo, portanto, ser utilizados para prevenir a formação de biofilmes bacterianos. Assim, este trabalho teve como objetivo avaliar o efeito inibidor de bomba de efluxo prometazina impregnada em cateter sobre a formação de biofilmes por bacilos Gram negativos associados à infecção do trato urinário. Foram utilizados 23 (5 *Escherichia coli*, 6 *Klebsiella pneumoniae*, 6 *Proteus mirabilis* e 6 *Pseudomonas aeruginosa*) isolados de bacilos Gram negativos. A sensibilidade dos isolados à prometazina foi avaliada nas formas planctônica e de biofilme. Avaliou-se o efeito da droga nas concentrações referentes a concentração inibitória mínima CIM, CIM/2 e CIM/4 sobre a formação de biofilmes e nas concentrações referentes a 2x concentração eliminatória mínima sobre o biofilme CEMB, CEMB e CEMB/2 sobre biofilmes maduros, utilizando a técnica de quantificação de biomassa. Ademais, fragmentos de cateter de Foley foram impregnados com prometazina 390 µg/mL e 3900 µg/mL para avaliar o efeito da droga sobre a formação de biofilmes na superfície dos cateteres, por meio da contagem de unidades formadoras de colônias (UFC). As CIMs de prometazina variaram de 97,6 a 781,25 µg/mL e as CEMBs variaram de 390,6 a 3125 µg/mL. A prometazina reduziu ($P < 0.05$) a biomassa dos biofilmes em formação, em todas as concentrações testadas, em 37,3%, 41,5% e 58,7%, da menor para a maior concentração. A impregnação dos cateteres com prometazina a 390 µg/mL de modo geral, não obteve resultados significativos, porém para as espécies de *Escherichia coli* e *Proteus mirabilis* a redução nas UFC's foi de 3 log. A impregnação dos cateteres com 3900 µg/mL de prometazina reduziu significativamente as UFC's das espécies estudadas, apresentando resultados significativos para todas elas e de modo geral a redução das UFC's foi superior a 5 log quando comparada ao controle. Quando em associação com antimicrobianos, a prometazina não apresentou efeito sinérgico com os antibióticos.

Palavras-chave: Infecções urinárias; Cateter de demora; Biofilme; Impregnação; Prometazina.

ABSTRACT

Urinary tract infection is one of the main complications related to health care, especially when it comes to the use of invasive medical devices. Indwelling bladder catheters are foreign bodies that are inserted into the urethra and made tolerant to bacterial colonization and biofilm development. Biofilms provide greater protection and bacterial resistance. Efflux pumps are important means of bacterial evasion of the action of antimicrobials and participate in the processes of formation and maintenance of bacterial biofilms, and can therefore be used to prevent the formation of bacterial biofilms. Thus, this study aimed to evaluate the inhibitory effect of a promethazine efflux pump impregnated in a catheter on the formation of biofilms by Gram-negative bacilli associated with urinary tract infection. 23 (5 *Escherichia coli*, 6 *Klebsiella pneumoniae*, 6 *Proteus mirabilis* and 6 *Pseudomonas aeruginosa*) isolates of Gram negative bacilli were used. The sensitivity of the isolates to promethazine was evaluated in planktonic and biofilm forms. The effect of the drug was evaluated in the concentrations referring to the minimum inhibitory concentration MIC, MIC/2 and MIC/4 on the formation of biofilms and in the concentrations referring to 2x minimum elimination concentration on the biofilm CEMB, CEMB and CEMB/2 on mature biofilms, using the biomass quantification technique. Furthermore, Foley catheter fragments were impregnated with promethazine 390 µg/mL and 3900 µg/mL to evaluate the effect of the drug on the formation of biofilms on the surface of the catheters, by counting colony forming units (CFU). Promethazine MICs ranged from 97.6 to 781.25 µg/mL and CEMBs ranged from 390.6 to 3125 µg/mL. Promethazine reduced ($P < 0.05$) the biomass of biofilms in formation, in all concentrations tested, by 37.3%, 41.5% and 58.7%, from the lowest to the highest concentration. The impregnation of the catheters with promethazine at 390 µg/mL, in general, did not obtain significant results, however for the species of *Escherichia coli* and *Proteus mirabilis* the reduction in CFU's was 3 log. The impregnation of the catheters with 3900 µg/mL of promethazine significantly reduced the CFU's of the studied species, presenting significant results for all of them and, in general, the reduction of CFU's was greater than 5 log when compared to the control. When combined with antimicrobials, promethazine did not show a synergistic effect with antibiotics.

Keywords: Urinary tract infections; Indwelling catheter; Biofilm; Impregnation; Promethazine.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	– Patogênese das infecções do trato urinário	17
Figura 2	– Cateteres tubulares com prata de Ambroise Paré.....	18
Figura 3	– Estrutura do cateter vesical de demora.....	19
Figura 4	– Véu do <i>Proteus</i> em placa de ágar.....	23
Figura 5	– Processo de formação de biofilmes microbianos.....	25
Figura 6	– Cateter vesical com 30 dias de uso.....	26
Figura 7	– Fórmula estrutural da prometazina.....	27
Figura 8	– Imagens obtidas por MEV dos fragmentos de cateter impregnados, não impregnados e submetidos ao processo de impregnação sem droga.....	50

LISTA DE GRÁFICOS

- Gráfico 1** – Ação da prometazina (PMZ) sobre a formação de biofilmes por bacilos Gram negativos associados à infecção do trato urinário..... 40
- Gráfico 2** – Ação da prometazina (PMZ) sobre a formação de biofilmes por *Escherichia coli* (n=5), *Klebsiella pneumoniae* (n=6), *Proteus mirabilis* (n=6) e *Pseudomonas aeruginosa* (n=6)..... 41
- Gráfico 3** – Ação da prometazina (PMZ) sobre biofilmes maduros de bacilos Gram negativos associados à infecção do trato urinário..... 42
- Gráfico 4** – Ação da prometazina (PMZ) sobre biofilmes maduros de *Escherichia coli* (n=5), *Klebsiella pneumoniae* (n=6), *Proteus mirabilis* (n=6) e *Pseudomonas aeruginosa* (n=6)..... 43
- Gráfico 5** – Efeito da impregnação de cateteres vesicais de demora com prometazina (390 µg/mL) sobre a formação de biofilmes de bacilos Gram negativos..... 44
- Gráfico 6** – Efeito da impregnação de cateteres vesicais de demora com prometazina (390 µg/mL) sobre a formação de biofilmes de *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis* e *Pseudomonas aeruginosa*..... 45
- Gráfico 7** – Efeito da impregnação de cateteres vesicais de demora com prometazina (3900 µg/mL) sobre a formação de biofilmes de bacilos Gram negativos..... 46
- Gráfico 8** – Efeito da impregnação de cateteres vesicais de demora com prometazina (3900 µg/mL) sobre a formação de biofilmes de *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis* e *Pseudomonas aeruginosa*..... 47
- Gráfico 9** – Efeito de ciprofloxacina (CIP) e meropenem (MER) sobre biofilmes maduros de *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis* e *Pseudomonas aeruginosa* formados em cateteres impregnados e não impregnados com prometazina..... 48
- Gráfico 10** – Efeito de ciprofloxacina (CIP) e meropenem (MER) sobre biofilmes por espécies de *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis* e *Pseudomonas aeruginosa* formados em cateteres impregnados e não impregnados com prometazina..... 49

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	14
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	16
2.1 Infecção do trato urinário (ITU).....	16
2.2 Cateter vesical.....	18
2.3 Infecção do trato urinário associada ao cateter (ITUAC).....	20
2.4 Patógenos microbianos associados a ITU.....	21
2.5 Biofilme.....	24
2.6 Prometazina.....	27
3.0 OBJETIVOS GERAL E ESPECÍFICOS.....	29
3.1 Objetivo geral.....	29
3.2 Objetivos específicos.....	29
4.0 METODOLOGIA.....	30
4.1 Local do estudo.....	30
4.2 Microrganismos do estudo.....	30
4.3 Determinação das Concentrações Inibitórias Mínimas (CIM) do inibidor de bomba de efluxo prometazina e dos antimicrobianos contra os isolados de <i>Escherichia coli</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Proteus mirabilis</i> e <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	31
4.3.1 Preparo dos inóculos.....	32
4.3.2 Preparação das drogas.....	32
4.3.3 Teste de sensibilidade por microdiluição.....	32
4.4 Análise da ação do inibidor de bomba de efluxo prometazina sobre a formação de biofilme dos isolados de <i>Escherichia coli</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Proteus mirabilis</i> e <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	33
4.5 Determinação da Concentração Erradicatória Mínima em Biofilme (CEMB) do inibidor de bombas de efluxo prometazina sobre os isolados do estudo.....	33
4.6 Análise da ação do inibidor de bomba de efluxo prometazina sobre a formação de biofilme dos isolados de <i>Escherichia coli</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Proteus mirabilis</i> e <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	34
4.7 Impregnação de fragmentos de cateter com prometazina.....	34
4.8 Determinação da ação da prometazina impregnada em cateter sobre a formação de biofilme de <i>Escherichia coli</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Proteus mirabilis</i> e <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	35

4.9 Avaliação da ação de antimicrobianos sobre biofilmes formados de <i>Escherichia coli</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Proteus mirabilis</i> e <i>Pseudomonas aeruginosa</i> em cateteres impregnados e não impregnados com prometazina.....	36
4.10 Análise estatística.....	37
5.0 RESULTADOS.....	38
5.1 Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração de Erradicação Mínima sobre Biofilmes (CEMB) da prometazina contra cepas de <i>E. coli</i> , <i>K. pneumoniae</i> , <i>P. mirabilis</i> e <i>P. aeruginosa</i>	38
5.2 Ação do inibidor de bomba de efluxo prometazina sobre a formação de biofilmes de <i>Escherichia coli</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Proteus mirabilis</i> e <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ...	39
5.3 Ação do inibidor de bomba de efluxo prometazina sobre biofilmes maduros de <i>Escherichia coli</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Proteus mirabilis</i> e <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ...	41
5.4 Ação da prometazina (390,6 µg/mL) impregnada em cateter sobre a formação de biofilmes de <i>Escherichia coli</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Proteus mirabilis</i> e <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	43
5.5 Ação da prometazina (3900 µg/mL) impregnada em cateter sobre a formação de biofilmes de <i>Escherichia coli</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Proteus mirabilis</i> e <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	45
5.6 Efeito dos antimicrobianos ciprofloxacina e meropenem em cateteres impregnados e não impregnados com prometazina sobre biofilmes de <i>Escherichia coli</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Proteus mirabilis</i> e <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	47
5.7 Análise por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) dos cateteres.....	49
6.0 DISCUSSÃO.....	51
7.0 CONCLUSÃO.....	54
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	55

1.0 INTRODUÇÃO

A Infecção do Trato Urinário (ITU) refere-se à invasão e proliferação de microrganismos na mucosa do trato urinário. É uma das principais causas de Infecção Relacionada à Assistência à Saúde (IRAS) em ambiente hospitalar, manifestando-se como uretrite, cistite, pielonefrite e bacteriúria. As ITUs representam um agravo de grande impacto epidemiológico no cenário da saúde, equivalente a cerca de 40% das IRAS, 70% das quais ocorrem em pacientes usuários de sonda vesical de demora, sendo a quarta maior causa de complicações em pacientes internados em países desenvolvidos associada a equipamentos médicos invasivos.

Os cateteres vesicais de demora são compostos de materiais sintéticos que são inseridos na uretra para auxiliar no esvaziamento vesical de pacientes em diversos setores hospitalares. Por se tratarem de corpos estranhos, microrganismos presentes na uretra ou aqueles que foram introduzidos no cateter por manuseio incorreto podem usar a superfície do cateter como substrato para a formação de biofilmes microbianos.

Nessa perspectiva, a infecção do trato urinário associada ao cateter (ITUAC) representa aumento nos custos ao sistema de saúde, eleva o tempo de internação hospitalar e agrava o quadro clínico dos usuários. Os cateteres urinários de demora são importantes ferramentas de assistência à saúde aos mais diversos quadros clínicos, porém o uso excessivo pode causar lesões no trato urinário, favorecer infecções e pôr em risco a segurança do paciente. Estima-se que aproximadamente 20% a 50% dos pacientes hospitalizados sejam submetidos a cateterismo vesical em algum momento da internação. Além do uso excessivo, outros fatores de risco são proeminentes para o desenvolvimento de infecções, como técnica de inserção do cateter, o seu manuseio e o tempo de permanência.

No que diz respeito ao uso de dispositivos médicos invasivos, a colonização bacteriana e o desenvolvimento de biofilmes são os principais problemas enfrentados. Assim, estudos recentes têm mostrado a eficácia de cateteres impregnados ou revestidos com substâncias antissépticas ou antimicrobianas contra a ação de uropatógenos. A impregnação reduz o risco de contaminação e aumenta a vida útil do cateter. No entanto, a exposição contínua a essas substâncias induz o desenvolvimento de cepas resistentes e o efeito antimicrobiano possui tempo limitado, muitas vezes apresentando o mesmo resultado de cateteres sem impregnação.

Os biofilmes são agregados microbianos formados pela adesão de bactérias a superfícies bióticas ou abióticas, envoltos por uma matriz extracelular polimérica

autoproduzida. Essa matriz confere maior tolerância a agentes antimicrobianos, aumentando a resistência em cerca de 1000 vezes, principalmente, por dificultar a penetração do antibiótico. Eles são responsáveis por cerca de 80% das infecções em humanos, principalmente aquelas associadas à inserção e à permanência de cateteres e outros dispositivos médicos invasivos.

Estudos recentes têm proposto o uso das fenotiazinas como inibidores das bombas de efluxo, atuando em sinergia com antimicrobianos ou potencializando seu efeito contra biofilmes microbianos. As bombas de efluxo são proteínas transmembranas capazes de transportar moléculas do interior das células microbianas para o meio extracelular, sendo extremamente importantes para extrusão de metabólitos tóxicos e para a formação de biofilmes, pois atua na extrusão de moléculas autoindutoras que orquestram toda a dinâmica dos biofilmes. O efluxo de moléculas, proporcionado pelas bombas de efluxo, constitui uma estratégia de resistência a antimicrobianos, por reduzir a concentração desses fármacos no ambiente intracelular. Nesse contexto, a prometazina, uma fenotiazina, tem sido descrita como capaz de interferir com a formação de biofilmes e desarranjar a estrutura de biofilmes, aumentando a sensibilidade a antibióticos previamente inefetivos.

O desenvolvimento de cepas resistentes aos antibióticos clássicos aumenta exponencialmente ao longo dos anos, sendo necessárias outras estratégias para o combate a essas infecções. Diante disso, o uso de fármacos não antimicrobianos para redução de infecções ou para alterar a dinâmica de formação de biofilmes vem sendo investigado. Nessa perspectiva, o uso de fármacos que agem sobre bombas de efluxo deve ser destacado.

2.0 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 INFECÇÕES DO TRATO URINÁRIO

O Trato Urinário (TU) humano é compreendido por um conjunto de estruturas, que de forma proximal para distal, são divididas em rins, ureteres, bexiga e uretra. O TU é um ambiente estéril em sua maior porção, sendo protegido contra ação de patógenos microbianos, devido à alta pressão do fluxo de urina, pela própria urina que é ácida e salina, pela ação da imunidade inata e de fatores antimicrobianos liberados no lúmen da uretra (SPENCER et al., 2014).

Apesar da defesa do trato urinário ser muito efetiva para a maioria das infecções, algumas bactérias que colonizam a porção distal da uretra podem ascender para o restante do trato urinário, driblar as defesas naturais do hospedeiro e causar um quadro infeccioso. Outras são deslocadas e conseguem alcançar as porções mais proximais do TU durante a inserção de cateteres vesicais, sejam eles de demora ou alívio (HICKLING; SUN; WU, 2015).

Por definição, a Infecção do Trato Urinário (ITU) é caracterizada por uma colonização de microrganismos em alguma porção do trato urinário, com exceção da parte final da uretra e pode levar ao surgimento de sintomas no paciente como dor ao urinar (disúria), aumento na frequência urinária (polaciúria), urgência miccional, sangue na urina (hematúria), lombalgia, febre e presença de leucócitos na urina (piúria). A ITU pode apresentar-se como uretrite (uretra), cistite (bexiga) ou pielonefrite (rins) (THOMAS., et al, 2010).

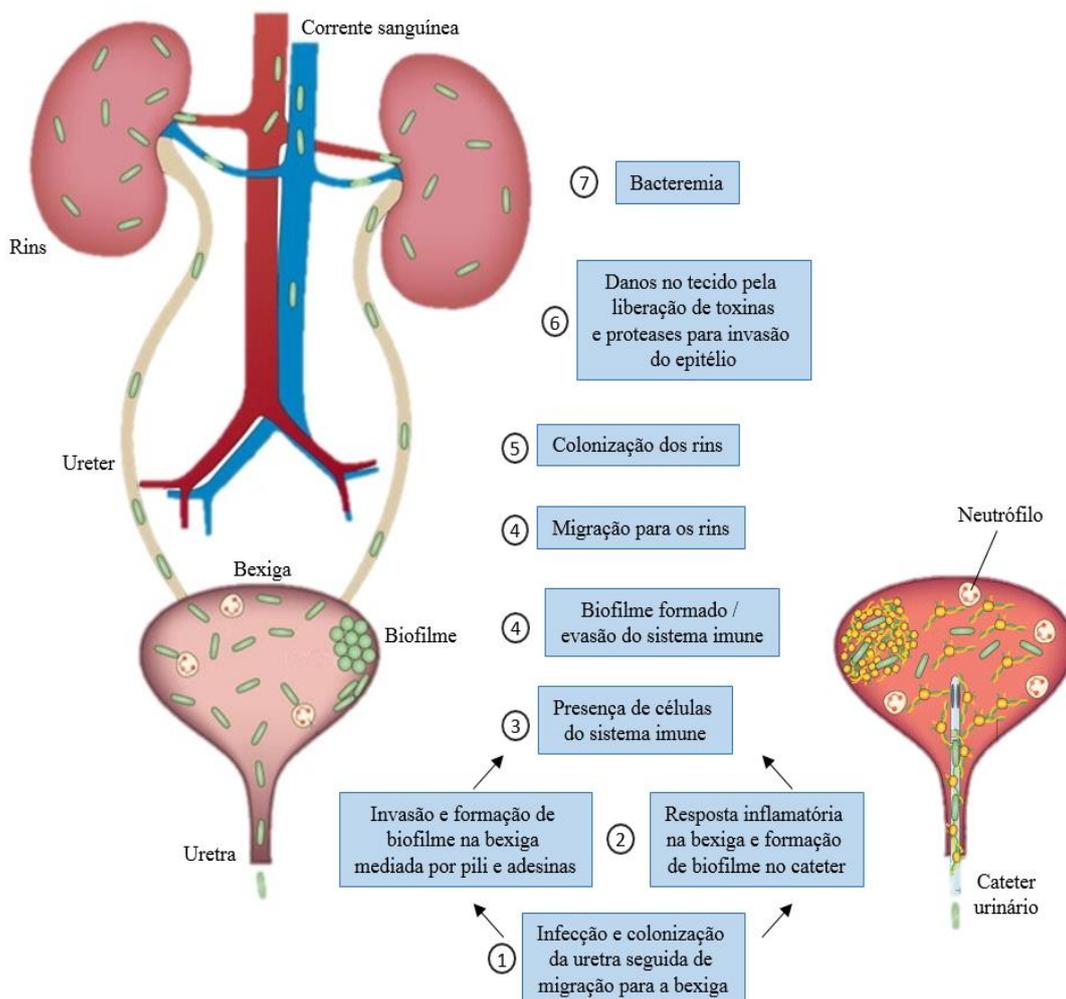
Os patógenos que causam ITUs pertencem principalmente à microbiota do próprio paciente. Dentro do espectro bacteriano, destacaram-se os organismos Gram-negativos, como *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis* e *Pseudomonas aeruginosa*. A infecção com os organismos Gram-negativos acima mencionados está associada à resistência antimicrobiana e à formação de biofilme. Além de patógenos bacterianos, as ITUs também podem ser causadas por fungos, sendo a levedura *Candida albicans*, o patógeno mais prevalente desse grupo de microrganismos (WEINER-LASTINGER et al., 2020).

Na comunidade, as ITUs afetam predominantemente a população feminina, com cerca de um terço das mulheres desenvolvendo ITU até os 24 anos de idade, necessitando de tratamento com antibióticos, enquanto metade dessa população terá pelo menos 1 episódio de ITU ao longo da vida, principalmente quadros de cistite (DIELUBANZA; SCHAEFFER, 2011).

É importante ressaltar que a incidência de cistite em mulheres é significativamente maior do que em homens, o que pode ser resultado de diferenças anatômicas. Especificamente, uma uretra feminina mais curta pode facilitar a transferência de bactérias da abertura uretral para a bexiga. A colonização do introito vaginal por patógenos gastrointestinais também pode aumentar a probabilidade de infiltração do trato urinário (DIELUBANZA; SCHAEFFER, 2011).

A colonização da uretra é o ponto de partida para o desenvolvimento da infecção. À medida que a uretra é colonizada, os microrganismos podem migrar para regiões do trato urinário, atingindo a parte superior do mesmo com o auxílio de estruturas de locomoção presentes na estrutura celular bacteriana como os pili ou através da inserção de um cateter vesical. A resposta imune inata do hospedeiro é mediada por neutrófilos, macrófagos, sistema completo e citocinas pró-inflamatórias que têm a função de fagocitose de bactérias. Algumas bactérias conseguem evadir o sistema imunológico através da formação de biofilme ou outros mecanismos de evasão celular (**Figura 1**) (FLORES-MIRELES *et al.*, 2015).

Figura 1- Patogênese da infecção do trato urinário.



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

Sabe-se que, os microrganismos patogênicos presentes na bexiga liberam toxinas e proteases para atacar as células hospedeiras e garantirem os nutrientes necessários para a colonização e, posteriormente ascenderem até os rins. Se não for tratada, a infecção pode evoluir repentinamente para bacteremia.

2.2 CATETER VESICAL

O cateterismo vesical é uma prática usada desde tempos remotos até os dias atuais. Os primeiros cateteres utilizados para esvaziamento da bexiga são datados de 1500 aC, onde tubos de madeira eram usados como canal para a saída de urina (HANAFY; SAAD; AL-GHORAB., 1974). Cateteres confeccionados com tubos de prata rígidos e moldados com cera para diminuir os danos no epitélio uretral foram utilizados por muito tempo (**Figura 2**). Esses cateteres não possuíam nenhuma maleabilidade por conta da composição com prata e a técnica de inserção gerava dores fortes que necessitavam da utilização de opiáceos e, por conta do dano uretral, ocasionava sangramentos intensos, o que facilitava ainda mais quadros infecciosos (NACEY; DELAHUNT, 1993)

Figura 2- Cateteres tubulares com prata de Ambroise Paré (1510–1590).



Fonte: Dix Livres de la Chirurgie. Trans. Thomas Johnson, London, 1649.

O cateterismo vesical é uma técnica que envolve a introdução de um cateter na uretra até que se comunique com a bexiga e permita o seu esvaziamento. Essa técnica é indicada para pacientes com distúrbios neurológicos que levam à disfunção da bexiga, para reduzir lesões por pressão ou outras lesões cutâneas que a urina possa afetar e para controlar a

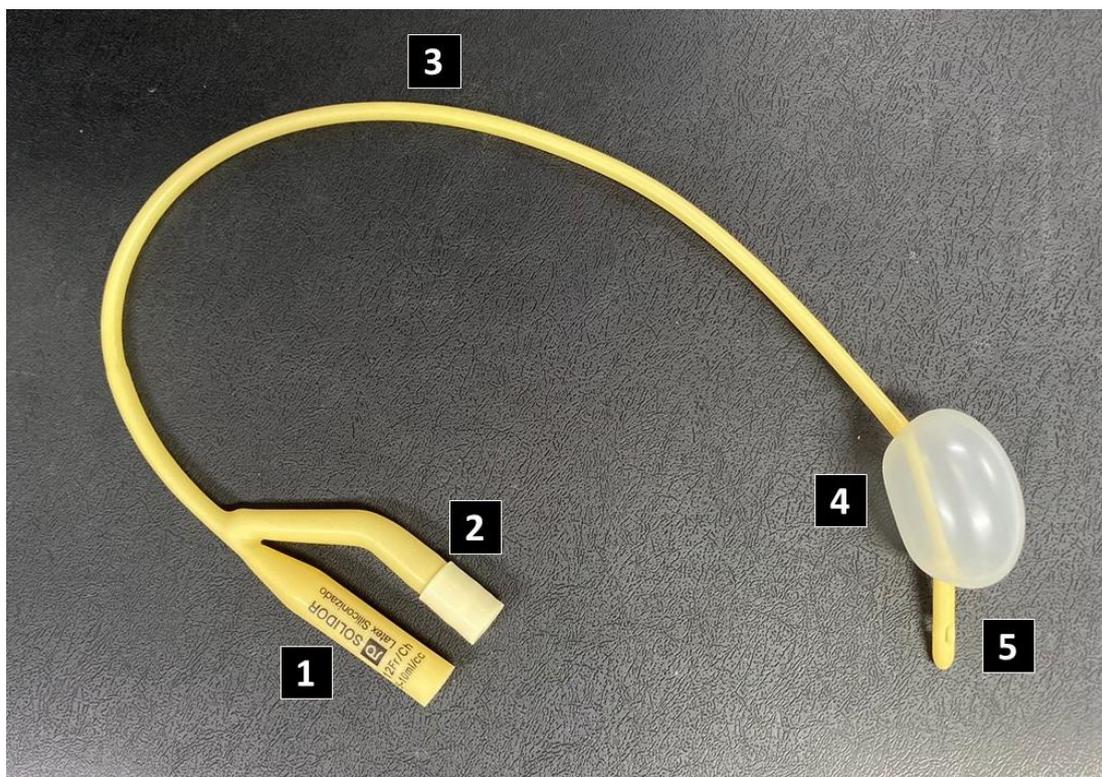
produção de urina no perioperatório e em ambientes de terapia intensiva (FENELEY; HOPLEY; WELLS, 2015).

Existem muitos tipos de materiais que compõem os cateteres vesicais, cada um com suas especificidades. Cateteres de látex possuem vantagens como a elasticidade, a durabilidade e menor desconforto quando comparados aos primeiros cateteres criados. No entanto, os cateteres de látex são citotóxicos e rugosos, podendo causar quadros de estenose uretral (RUUTU; ALFTHAN; TALJA., 1985).

Diante disso, vale ressaltar que os cateteres uretrais usados atualmente são compostos por látex e possuem uma camada de silicone externa que é menos alérgica e permite a diminuição do atrito com a parede do urotélio, além de ser mais lisa, o que dificulta a formação de biofilmes em sua estrutura (LAWRENCE; TURNER., 2006).

A estrutura do cateter tipo Foley é caracterizada por ser simples, tubular, sendo formada por 2 canais, um para permitir a saída de urina e o outro tem comunicação com o balão que é preenchido com água destilada dentro da bexiga para permitir a sua fixação. Na porção final do cateter que fica posicionada dentro da bexiga, existe um orifício que é a porta de entrada da urina para que ela possa ser drenada (**Figura 3**). Além disso, o cateter tipo Foley é comercializado em embalagem estéril para que possa ser inserido sem causar infecção.

Figura 3- Estrutura do cateter vesical de demora.



Fonte: Elaborado pelo autor.

(1) Local de drenagem de urina. (2) Acesso para insuflar o balão. (3) Corpo do cateter com estrutura tubular. (4) Balão insuflado. (5) Orifício de entrada de urina.

É importante ressaltar que, devido à alta incidência de formação de biofilme nos cateteres urinários, a busca por estratégias para reduzir a adesão de microrganismos vem sendo empregada, como o revestimento dos mesmos com substâncias antimicrobianas. Os cateteres revestidos com ligas de prata apresentam resultados promissores, diminuindo significativamente a contaminação, porém, o curto período de ação do efeito antimicrobiano é um aspecto que os mantém subutilizados (GAUHAR, 2022). Existem também cateteres que utilizam nitrofurazona, um antibiótico da classe dos nitrofuranos, como revestimento, que promove a inibição da formação de biofilmes. Em contrapartida, a descoberta de seus efeitos teratogênicos fez com que as pesquisas com esse tipo de cateter fossem interrompidas.

Além das substâncias acima, vários outros agentes antimicrobianos foram testados como revestimentos para cateteres vesicais tipo Foley, incluindo: rifampicina, clorexidina e triclosan. No entanto, seus efeitos são limitados, pois os biofilmes formados por *Proteus mirabilis* são capazes de alcalinizar a urina e formar cristais que revestem o cateter com agentes antimicrobianos, impedindo a ação antimicrobiana e promovendo adesão bacteriana.

2.3 INFECÇÕES DO TRATO URINÁRIO ASSOCIADA A CATETER

A Infecção do Trato Urinário Associada ao Cateter (ITUAC) é caracterizada por quadro infeccioso cujo paciente apresenta bacteriúria, estando com Sonda Vesical de Demora (SVD) no momento ou que passou por algum cateterismo vesical nas últimas 48 horas. A bacteriúria pode ou não estar associada aos sinais e sintomas descritos na sessão anterior. Esse quadro infeccioso é decorrente de microrganismos presentes no lúmen do cateter ou na parte externa decorrente de contaminações durante sua inserção (THOMAS., et al, 2010).

A ITUAC é a Infecção Relacionada à Assistência à Saúde (IRAS) mais prevalente no ambiente hospitalar e uma das infecções mais recorrentes na comunidade (MAGILL., et al, 2014). De modo geral, mais de 60% das ITUs são desenvolvidas em pacientes com uso de cateter vesical, tornando esse dispositivo médico um fator de risco importante. Somado a esses dados, cerca de 15% a 25% de todos os pacientes hospitalizados serão cateterizados em algum momento durante a internação hospitalar (KRANZ, J; SCHMIDT, S; WAGENLEHNER, F; SCHNEIDEWIND, L, 2020).

O cateterismo vesical é um procedimento importante na assistência aos pacientes, porém é uma técnica que possui riscos, sendo a ITUAC uma das principais desvantagens associadas à inserção de cateteres vesicais. Para tanto, é necessário que haja indicação para a inserção e permanência. Entretanto, somente 7,7% dos cateteres inseridos em ambiente hospitalar possuem indicação adequada e 80% dos pacientes que apresentaram infecção não possuem indicação apropriada para a introdução e continuidade do cateterismo (MOTA: OLIVEIRA., 2019).

Entre os principais fatores de risco para o desenvolvimento de ITUAC está o tempo de permanência do cateter. Segundo dados da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) (BRASIL.,2017), a taxa de colonização microbiana de cateteres vesicais é de 5-10% por dia de uso. No final de quatro semanas, todos os pacientes em uso de cateteres estarão apresentando algum quadro infeccioso (CHENOWETH; GOULD; SAINT., 2014).

Com base nos fatores de risco e possibilidades de surgimento de quadros infecciosos, uma das alternativas de prevenção das ITUACs é a utilização do Cateterismo Intermitente (CI) frente a necessidade de um cateterismo vesical. Diferente do cateterismo de demora, o CI é caracterizado pela não permanência do cateter dentro da uretra por longos períodos de tempo. Com essa técnica são programados horários para a inserção do cateter de modo a esvaziar a bexiga e, posteriormente, é retirado, deixando a uretra livre e diminuindo a chance de haver colonização bacteriana na uretra e possível formação de biofilmes microbianos.

Apesar do cateterismo intermitente (cateterismo vesical de alívio) se tratar de uma alternativa frente as infecções causadas pelo uso de cateteres vesicais de demora, o CI também possui suas desvantagens. A necessidade de realização do cateterismo de alívio em intervalos programados gera uma demanda de serviço grande para os profissionais de enfermagem. Além disso, a introdução do cateter de alívio com maior frequência pode gerar falso trajeto, levando o paciente a uretrorragia, por vezes, severa (ERCOLE *et al*, 2013).

2.4 PATÓGENOS MICROBIANOS ASSOCIADOS A ITU

Os microrganismos que causam ITUs diferem entre fungos leveduriformes e bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, sendo os últimos, os patógenos predominantes com destaque epidemiológico. Entre as espécies com impacto epidemiológico destacam-se: *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albicans*, *Staphylococcus saprophyticus* e *Enterococcus faecalis* (RONALD, 2002).

O aumento da resistência bacteriana em uropatógenos de pacientes com sonda vesical de demora tem sido associado à terapia antimicrobiana para outras indicações além da ITU. Bactérias resistentes a medicamentos são frequentemente identificadas em amostras de urina devido à alta exposição a agentes antimicrobianos em ambientes hospitalares (NICOLLE, 2014).

Escherichia coli é um bacilo Gram-negativo, fermentador anaeróbico facultativo de açúcar, pertencente à família Enterobacteriaceae. É simbiótico no trato gastrointestinal de humanos e animais, podendo causar infecções no trato gastrointestinal, urinário, reprodutivo, principalmente à nível prostático, e na corrente sanguínea (MORATO et al., 2009).

As cepas de *E. coli* podem ser divididas em dois grandes grupos em termos de patogenicidade. As responsáveis por infecções intestinais são agrupadas em InPEC e as que causam infecções fora do trato digestivo são ExPEC. Categoricamente, a *E. coli* InPEC pode ser dividida em: enteroagregativa (EAEC), enteropatogênica (EPEC), enteroinvasiva (EIEC), enterohemorrágica (EHEC), enterotóxica (ETEC), difusa aderente (DAEC) e invasiva aderente (AIEC). Dentre as ExPECs, as UPECs (uropatógenos) causam infecções do trato urinário (ROJAS-LOPEZ et al., 2018).

UPECs em ITUs podem atacar células hospedeiras que revestem a bexiga. Desta forma, as UPECs são introduzidas no citoplasma das células e se multiplicam para formar um agregado bacteriano semelhante a um biofilme chamado comunidade bacteriana intracelular (IBC). Outras UPECs que não desenvolvem IBC podem permanecer em estado vegetativo nas células da bexiga e impedir a ação de antimicrobianos e neutrófilos (ETO; SUNDSBAK; MULVEY, 2006).

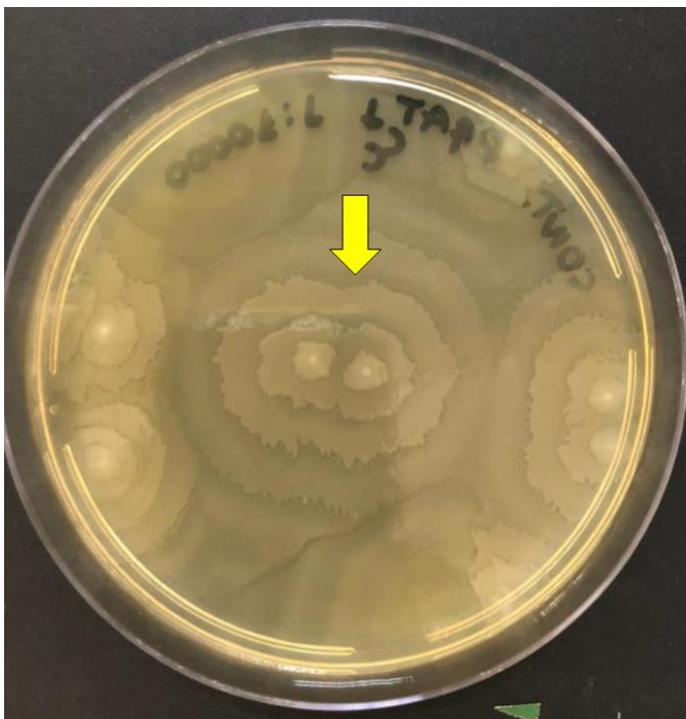
Klebsiella pneumoniae foi descoberta e descrita pela primeira vez por Carl Friedlander em 1882 como uma bactéria isolada encontrada nos pulmões de pessoas que vieram à óbito por pneumonia. É um bacilo Gram-negativo, anaeróbico facultativo, fermentador de lactose, encapsulado. Devido ao revestimento polissacarídico, seu crescimento em ágar tem uma aparência viscosa. É um patógeno comensal encontrado no trato digestivo de humanos, mas também pode ser encontrado em plantas e animais (FRIEDLAENDER, 1882; OPOKU-TEMENG; KOBAYASHI; DELBO, 2019).

É um patógeno oportunista que infecta pacientes hospitalizados e imunocomprometidos. As infecções são, portanto, comuns em unidades de terapia intensiva e em pacientes submetidos a procedimentos médicos invasivos. É um dos fatores etiológicos de pneumonia, infecções do trato urinário, infecções de feridas, infecções sanguíneas e abscessos hepáticos (PACZOSA; MECSAS, 2016).

A rápida evolução de cepas multirresistentes nas últimas décadas ressalta que *Klebsiella pneumoniae* representa uma ameaça clínica global e que cepas contendo carbapenemases e beta-lactamases de amplo espectro limitam o arsenal antimicrobiano para combater essa bactéria. Outro fator de virulência se deve à alta produção de cápsulas conferindo hiper mucosidade, intimamente relacionado a cepas hiper virulentas (FOLLADOR et al., 2016; MUNOZ-PRICE et al., 2013; WYRES; HOLT, 2018).

Proteus mirabilis é um bacilo Gram-negativo pertencente à família Morganellaceae. É encontrado no trato digestivo de humanos e animais, mas também pode estar presente em fontes de água, solo e esgoto. Possui um crescimento característico em placas de ágar conhecido como "véu de *Proteus*" por ser um organismo flagelado móvel (**Figura 4**) (MOBLEY, 2019; WENNER; RETTGER, 1919).

Figura 4- Véu do *Proteus* em placa de ágar BHI.



Fonte: elaborada pelo autor.

Apesar de não ser a causa primária na comunidade de ITU, é um dos principais agentes etiológicos quando se trata da utilização de cateteres vesicais de demora. Além da ITU-AC, o *Proteus mirabilis* também causa infecções em feridas, no trato gastrointestinal, olhos, trato respiratório, nariz, pele e estômago. Infecções por *Proteus mirabilis* são frequentes em idosos e pessoas com diabetes tipo 2 (MATTHEWS; LANCASTER, 2011; O'HARA; BRENNER; MILLER, 2000).

A degradação da ureia pela urease produzida pelo *Proteus mirabilis* produz amônia que é responsável por aumentar o pH do meio. O ambiente alcalino propicia a precipitação de íons, principalmente cálcio e magnésio, levando à formação de cálculos urinários. Associado às bactérias, esses cálculos podem compor biofilmes cristalinos, um tipo exclusivo do *Proteus mirabilis*. A amônia proveniente da degradação da ureia ainda pode ser utilizada como fonte de nitrogênio para outras espécies bacterianas e, juntamente com substratos minerais, torna o ambiente favorável à colonização. Portanto, infecções por *Proteus mirabilis* são frequentemente infecções polimicrobianas (SCHAFTE; PEARSON, 2015; CHEW et al., 2012; GRIFFITH; MUSER; ITIN, 1976; ARMBRUSTER; MOBLEY, 2017).

Pseudomonas aeruginosa é um bacilo Gram-negativo, aeróbico e móvel, produtor dos pigmentos piocianina e pioverdina, que funcionam como fatores de virulência e causam, no ágar de crescimento bacteriano ou em cateteres, alteração de cor para azul ou verde, respectivamente. Pode ser encontrado no solo e ambientes aquáticos. É um microrganismo oportunista que pode causar infecções do trato respiratório e urinário, além de infecções na corrente sanguínea e em feridas, sendo o agente causador de muitas IRASs. Além disso, é um importante agente colonizador de dispositivos médicos como cateteres, sondas e umidificadores (MIELKO et al., 2019; LISTER; WOLTER; HANSON, 2009).

Sabe-se que a *Pseudomonas aeruginosa* tem alta capacidade de formação de biofilme com sistema de *quorum sensing*, produção de sideróforos, resistência natural a antimicrobianos e a alta propensão a adquirir resistência. Sua alta taxa de resistência também se deve à baixa permeabilidade da membrana e à expressão abundante de bombas de efluxo na superfície de membrana, que impedem a penetração de agentes antibacterianos, reduzindo assim a concentração de antibióticos no meio intracelular. Devido a todas essas características, a *Pseudomonas aeruginosa* representa uma grande ameaça aos sistemas de saúde em todo o mundo, pois seu arsenal de resistência a antibióticos permite que ela evite tratamentos antimicrobianos (HAUSER., 2011; PEREIRA; ROSA; CARDOSO, 2015).

2.5 BIOFILME

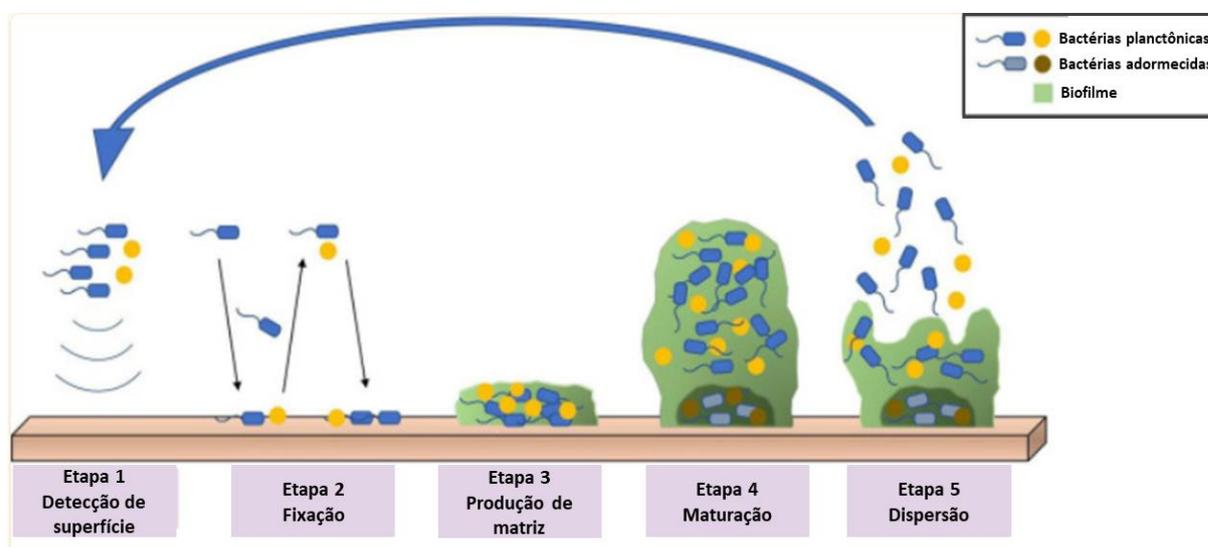
Os biofilmes são agregados microbianos formados pela adesão de bactérias a superfícies bióticas ou abióticas, envoltos por uma matriz extracelular polimérica autoproduzida. Essa matriz confere maior tolerância a agentes antimicrobianos, aumentando a resistência em cerca de 1000 vezes, principalmente, por dificultar a penetração do antibiótico (BRAUNER; FRIDMAN; GEFEN; BALABAN, 2016). Eles são responsáveis por cerca de

80% das infecções em humanos, principalmente aquelas associadas à inserção e à permanência de cateteres e outros dispositivos médicos invasivos (BANDARA; MATSUBARA; SAMARANAYAK, 2016).

Muitas espécies bacterianas são capazes de fazer a transição de vida livre (ou seja, forma planctônica) para um estado de biofilme. Em biofilmes, garantem tolerância e resistência a condições desfavoráveis e hostis. Os biofilmes na uretra resistem à força de ejeção internada pela urina e os biofilmes absorvidos resistem à tração no lúmen uretral. Além disso, uma matriz extracelular polimérica impede a ação do sistema imune e a difusão de agentes antimicrobianos na comunidade do biofilme, limitando assim o efeito antimicrobiano e protegendo as bactérias do interior do biofilme (RABIN *et al.*, 2015).

O processo de formação do biofilme é dividido em 5 partes, a saber: detecção de superfície, fixação, produção de matriz, maturação e dispersão (**Figura 5**). A primeira consiste na identificação de superfícies que estão aptas a serem colonizadas. A segunda envolve a ligação de bactérias a superfícies, um processo mediado principalmente pelas forças de van der Waals. Após a fixação, as bactérias formam uma matriz extracelular que as recobre e produz a matriz até o final desta etapa para garantir a adesão máxima. À medida que o biofilme amadurece completamente, os canais internos são responsáveis pela distribuição de nutrientes e água para aumentar o tamanho do biofilme, esta etapa compreende a maturação. Ademais, as células que compõem um biofilme ou parte dele se dispersam para formar novos biofilmes (RABIN *et al.*, 2015).

Figura 5- Processo de formação de biofilmes microbianos.



Fonte: CHANG., *et al*, 2022

Inserir um cateter de demora na uretra aumenta a chance de formação de biofilme, o que pode levar a ITUs. Corpos estranhos sintéticos, como cateteres, fornecem um bom substrato para adesão bacteriana. Essa colonização e formação de biofilme pode ocorrer tanto em superfícies internas quanto externas (**Figura 6**) (JACOBSEN et al., 2008)

Figura 6- Cateter vesical com 30 dias de uso. A seta aponta para região com provável biofilme formado. A região enrugada do cateter é a porção do balão após desinflar.



Fonte: elaborada pelo autor.

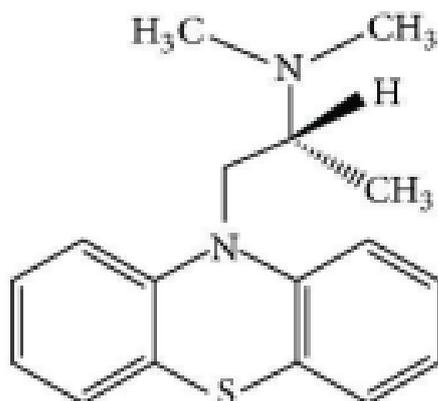
As bombas de efluxo existem em bactérias na forma planctônica e fornecem o efluxo de substâncias internas bacterianas, que podem ser toxinas antimicrobianas ou nocivas. Algumas espécies são capazes de expressar bombas de efluxo na forma de biofilmes, promovendo ainda mais a virulência do biofilme e aumentando sua resistência (ZHANG et al., 2008).

Além disso, as bombas de efluxo são proteínas transmembranas capazes de transportar moléculas do interior das células microbianas para o meio extracelular, sendo extremamente importantes para extrusão de metabólitos tóxicos e para a formação de biofilmes, pois atua na extrusão de moléculas autoindutoras que orquestram toda a dinâmica dos biofilmes (ABISADO et al., 2018). O efluxo de moléculas, proporcionado pelas bombas de efluxo, constitui uma estratégia de resistência a antimicrobianos, por reduzir a concentração desses fármacos no ambiente intracelular.

2.6 PROMETAZINA

A prometazina ((RS)-N,N-dimetil-1-(10H-fenotiazina-10-il)propan-2-amina cloridrato) (**Figura 7**) pertence à classe das fenotiazinas. Age como antagonista dos receptores H1 da histamina, ou seja, possui ação anti-histamínica. Esses receptores estão presentes principalmente nos músculos lisos e nas células endoteliais (MITSUCHASHI; PAYAN, 1989). Desde sua primeira utilização, em 1946, vem sendo usada para prevenir e tratar náuseas e vômitos com ação antiemética e pode causar também ação sedativa intensa (CANTISANI *et al*, 2013).

Figura 7- Fórmula estrutural da prometazina.



Fonte: CANTISANI *et al*, 2013

Fármacos pertencentes à classe das fenotiazinas como a prometazina e a clorpromazina possuem atividade antimicrobiana contra bactérias Gram positivas e Gram negativas resistentes aos antimicrobianos clássicos (AGUILAR-VEJA *et al*, 2021). Além disso, sabe-se que a prometazina em doses suberradicatórias é capaz de diminuir a biomassa de biofilmes bacterianos e além disso, também é capaz de penetrar na estrutura do biofilme causando danos nas células protegidas pela matriz polimérica que os reveste (SIDRIM *et al*, 2017).

A prometazina também possui ação antifúngica, estudos mostram a efetividade da prometazina sobre as células planctônicas e em biofilmes das espécies de *Fusarium solani*, *Candida albicans* e *Cryptococcus neoformans*, sendo capaz de desestruturar os biofilmes e de inibir o crescimento fúngico planctônico (BRILHANTE *et al*, 2020; BRILHANTE *et al*, 2018; FIALLOS *et al*, 2022). Ademais, Castelo-Branco *et al*, 2013 encontraram evidências da ação sinérgica entre prometazina e fármacos antifúngicos, ou seja, a ampliação do efeito antifúngico pela prometazina.

Além das ações supracitadas, a prometazina também é descrita como capaz de inibir a formação de biofilmes, ou desarranja-los e ainda de potencializar a ação de antimicrobianos sobre biofilmes antes inefetivos. Essa ação se manifesta através da inibição de bombas de efluxo que conferem importante fator de resistência para cepas bacterianas evadirem ação de fármacos (CHAN; ONG; CHUA, 2007; SIDRIM *et al*, 2017).

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar o efeito do inibidor de bomba de efluxo prometazina impregnado em cateter sobre biofilmes por bactérias associadas a infecção do trato urinário.

3.2 Objetivos específicos

1. Determinar as Concentrações Inibitórias Mínimas (CIMs) para prometazina, ciprofloxacina e meropenem e as Concentrações Erradicatória Mínimas sobre os biofilmes (CEMB) *in vitro* para prometazina contra os isolados de *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis* e *Pseudomonas aeruginosa*.

2. Avaliar o efeito *in vitro* do inibidor de bombas de efluxo prometazina sobre a formação de biofilmes e sobre biofilmes maduros de *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis* e *Pseudomonas aeruginosa*.

3. Avaliar a formação de biofilmes de *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis* e *Pseudomonas aeruginosa* em cateteres impregnados com o inibidor de bombas de efluxo prometazina.

4. Avaliar a ação da prometazina impregnada em cateter em associação com antimicrobianos;

4. METODOLOGIA

4.1 Local do estudo

O presente estudo foi realizado no Laboratório de Bacteriologia do Grupo Aplicado em Microbiologia Médica (GrAMM), localizado no Centro de Biomedicina da Universidade Federal do Ceará no Campus Porangabussu em Fortaleza-CE.

4.2 Microrganismos do estudo

Foram utilizadas 23 cepas bacterianas pertencentes à bacterioteca do acervo do GrAMM. Dessas cepas, 4 eram *Escherichia coli*, 5 *Klebsiella pneumoniae*, 5 *Proteus mirabilis* e 5 *Pseudomonas aeruginosa* (tabela 1). Todos os isolados usados no estudo foram oriundos de amostras de urinas, e previamente isolados, processados e identificados através do VITEK 2® (Biomérieux).

Além dos microrganismos supracitados, foram adicionadas uma cepa ATCC (American Type Culture Collection) à cada espécie da pesquisa, doadas da Coleção de Microrganismos de Referência em Vigilância Sanitária (CMRVS), FIOCRUZ-INCQS, Rio de Janeiro (RJ), com as seguintes identificações: *Escherichia coli* INCQS 00033 (ATCC 25922), *Klebsiella pneumoniae* INCQS 00532 (ATCC 600703), *Proteus mirabilis* INCQS 00265 (ATCC 29906) e *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853). Todos os isolados foram submetidos a uma bateria de provas bioquímicas para certificação de identidade da espécie.

Tabela 1- Descrição dos microrganismos presentes no estudo.

Isolado bacteriano	Código	Origem
<i>Escherichia coli</i> ATCC	ECAT	ATCC 25922
<i>Escherichia coli</i>	ECS5	Urina
<i>Escherichia coli</i>	ECS8	Urina
<i>Escherichia coli</i> enteroagregativa	ECEC	Referência
<i>Escherichia coli</i>	EC2R	Urina
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC	KLAT	ATCC 600703
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	KL1S	Urina
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	KL2S	Urina
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	KL1B	Urina
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	KL2B	Urina
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	KL2M	Urina
<i>Proteus mirabilis</i> ATCC	PRAT	ATCC 29906
<i>Proteus mirabilis</i>	PRS1	Urina

<i>Proteus mirabilis</i>	PRS4	Urina
<i>Proteus mirabilis</i>	PRS5	Urina
<i>Proteus mirabilis</i>	PRMR1	Urina
<i>Proteus mirabilis</i>	PRMR2	Urina
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC	PAATCC	ATCC 29213
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	PAS1	Urina
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	PAR1	Urina
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	PAR4	Urina
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	PAR6	Urina
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	PAM1	Urina

Como critério de inclusão dos microrganismos no estudo, os isolados foram avaliados quanto à capacidade de formação de biofilmes. Somente os microrganismos capazes de formar biofilme participaram da pesquisa. Para avaliação da capacidade de formação de biofilmes pelas espécies estudadas, utilizou-se o protocolo modificado de Stepanovic *et al* (2004, 2007). Para tal experimento, foi utilizada uma placa de 96 poços de microtitulação de fundo chato. Um inóculo bacteriano (25 µL) foi adicionado à solução de 175 µL de caldo infusão de cérebro e coração enriquecido com 1% de glicose numa proporção de (1,7 x 10⁷ ufc/mL). Posteriormente a inoculação, as placas foram incubadas em estufas bacteriológicas por 48 horas a 37° C. Ao experimento, foram incluídos poços com ausência de inóculos como controle de esterilidade.

Decorrido o tempo de incubação, as placas foram lavadas, coradas com técnica por cristal violeta e analisadas no espectrofotômetro no comprimento de onda de 490nm (DO 490) para avaliação da densidade óptica e, conseqüentemente, a determinação da biomassa dos biofilmes.

4.3 Determinação das Concentrações Inibitórias Mínimas (CIM) do inibidor de bomba de efluxo prometazina e dos antimicrobianos contra os isolados de *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis* e *Pseudomonas aeruginosa*

A avaliação da sensibilidade dos 23 isolados foi testada sob a ação da prometazina (SANVAL®) e aos antimicrobianos ciprofloxacina (SIGMA-ALDRICH®) e meropeném (SIGMA-ALDRICH®) segundo as recomendações do documento M100-S27 do Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI, 2022). A avaliação da sensibilidade das cepas de

Escherichia coli (ATCC 25922) e *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) à droga ciprofloxacina (CLSI, 2022), certificou a validação do experimento.

4.3.1 Preparo dos inóculos

Os isolados bacterianos foram previamente semeados em placas de petri contendo ágar BHI, incubados em estufa bacteriológica por 24 horas a 37° C. Após o tempo de incubação, os inóculos foram preparados em tubos de hemólise contendo solução salina 0,9% estéril, ajustando a turbidez visualmente para a escala de 0,5 McFarland, que corresponde a $1,5 \times 10^8$ ufc/mL. Posteriormente, os inóculos foram diluídos em caldo Mueller Hinton (MH) até alcançarem a concentração de 5×10^5 ufc/mL.

4.3.2 Preparação das drogas

As concentrações testadas para prometazina variaram de 6.250 – 12,2 µg/mL, para a ciprofloxacina as concentrações utilizadas variaram de 32 - 0,0625 µg/mL e para o meropenem variaram de 16 - 0,03125 µg/mL.

4.3.3 Teste de sensibilidade por microdiluição

Para a avaliação da sensibilidade dos 23 isolados para as 3 drogas testadas, foram utilizadas placas de 96 poços de fundo em U. Nelas foram adicionados 100 µL de caldo MH em cada poço. Em seguida, adicionou-se mais 100 µL do composto formado por caldo MH juntamente com as drogas nas maiores concentrações supracitadas nos primeiros poços de cada linha da placa. Após essa etapa, realizou-se a microdiluição, retirando 100 µL do primeiro poço e inserindo no segundo. Logo depois, 100 µL do segundo e inserindo no terceiro e assim repetidas vezes até o poço de número 10 da linha. Do poço 10, foi retirado 100 µL e despejado no poço 12 da linha, o qual foi usado como controle de esterilidade. No poço 11 não foi adicionada a solução contendo a droga, somente 100 µL de caldo MH e 100 µL do inóculo bacteriano, tornando-o controle de crescimento. Após a diluição dos compostos na placa, foram adicionados 100 µL de inóculo bacteriano, nos poços 1 ao 11 de cada linha da placa. Posteriormente, foi incubado em estufa bacteriológica a 37 °C, por 24 horas.

A leitura foi realizada por meio de inspeção visual conforme recomendações do CLSI, 2017. A CIM para prometazina, para ciprofloxacina e para o meropenem foi determinada como a menor concentração capaz de inibir 100% do crescimento bacteriano.

4.4 Análise da ação do inibidor de bomba de efluxo prometazina sobre a formação de biofilme dos isolados de *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis* e *Pseudomonas aeruginosa*

Para a avaliação do efeito da prometazina sobre a formação de biofilmes bacterianos dos 23 isolados do estudo, utilizaram-se placas de 96 poços de micro titulação de fundo chato de acordo com o protocolo de Bandeira *et al.* (2013). Primeiramente, os isolados foram semeados em placas de BHI ágar e incubadas por 24 horas a 37° C. Decorrido o tempo de incubação, foram feitos inóculos das colônias dos isolados crescidas nas placas com solução salina 0,9 % estéril até atingirem a turvação de 0,5 McFarland, que corresponde a $1,5 \times 10^8$ ufc/mL.

Para este ensaio, foram utilizadas as concentrações de CIM dos isolados e duas concentrações subinibitórias (CIM/2 e CIM/4). As soluções diluídas dos compostos foram preparadas em tubos Falcon estéreis de 15 mL e distribuídas em placas de 96 poços. Nas colunas 1, 2 e 3 da placa de 96 poços, foram inseridos 175 µL de BHI caldo enriquecido com 1% de glicose, nas colunas 4, 5 e 6 foram adicionados 175 µL da solução de BHI caldo com glicose a 1% com a prometazina na maior concentração (CIM), nas colunas 7, 8 e 9 adicionou-se 175 µL de caldo BHI com glicose a 1% com prometazina na concentração intermediária (CIM/2) e nas colunas 10, 11 e 12 foi adicionado 175 µL de BHI caldo com 1% de glicose com a menor concentração do composto testado (CIM/4). Em seguida, adicionou-se 25 µL do inóculo bacteriano a cada poço da placa. Após essa etapa, a placa foi levada para estufa bacteriológica por 48 horas com temperatura de 37 °C.

Posteriormente a incubação, foi realizada coloração dos biofilmes com cristal violeta e a quantificação da sua biomassa através da leitura por espectrofotometria nos comprimentos de onda de 490 nm (DO490) (BANDEIRA *et al.*, 2013).

4.5 Determinação da Concentração Erradicatória Mínima em Biofilme (CEMB) do inibidor de bombas de efluxo prometazina sobre os isolados do estudo

A Concentração Erradicatória Mínima em Biofilme (CEMB) é a menor concentração capaz de causar morte dos microrganismos que compõem a estrutura do biofilme. Para a avaliação da sensibilidade dos biofilmes dos isolados testados sob a ação da prometazina foi utilizado o mesmo protocolo de formação de biofilmes supracitado.

Após as 48 horas da formação dos biofilmes, os poços da placa de 96 poços foram lavados com 100 µL de solução salina 0,9% estéril e adicionou-se 100 µL de BHI caldo enriquecido com 1 % de glicose em cada poço. Os valores das concentrações de prometazina testados foram selecionados de acordo com o teste de sensibilidade realizado anteriormente. Em seguida, adicionou-se 100 µL da solução contendo prometazina no primeiro poço e foi realizada uma diluição seriada até o poço de número 12. Dessa forma, a concentração de prometazina para o presente ensaio variou de 6.250 - 3,051 µg/mL.

Posteriormente, as placas foram incubadas novamente em estufa bacteriológica por mais 24 horas a 37° C. Decorrido o período de incubação, foi adicionado 20 µL do corante resazurina a cada poço da placa de 96 poços pelo tempo de uma hora. Uma hora após a ação da resazurina, que possui uma reação colorimétrica a depender do metabolismo, as placas foram lidas de forma visual para determinações de CEMB.

4.6 Análise da ação do inibidor de bomba de efluxo prometazina sobre a formação de biofilme dos isolados de *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis* e *Pseudomonas aeruginosa*

Para a determinação da ação do composto sobre biofilmes maduros, foram adicionados inicialmente 175 µL de caldo BHI enriquecido com glicose a 1% nos poços da placa de micro titulação de 96 poços de fundo chato. Em seguida, foram adicionados 25 µL do inóculo bacteriano na turbidez de 0,5 na escala de McFarland. As placas foram levadas à estufa bacteriológica, onde ficaram incubadas por 48 horas a 37° C.

Após o período de incubação, os poços da placa foram lavados com PBS (Phosphate-Buffered Saline) estéril. Após a lavagem, foram adicionadas às placas, soluções contendo prometazina nas concentrações de 2xCEMB, CEMB e CEMB/2 para cada isolado do ensaio. As placas foram então incubadas em estufas bacteriológicas por mais 24 horas a 37° C. Decorrido esse tempo, as placas foram lidas através da determinação da biomassa através de espectrofotometria no comprimento de onda de 490 nm (DO490).

4.7 Impregnação de fragmentos de cateter com prometazina

O processo de impregnação de cateteres vesicais com prometazina foi realizado segundo o protocolo de Amando (2018). Utilizaram-se os cateteres de látex revestidos com silicone (nr 12, SOLIDOR®). Primeiramente, os cateteres foram cortados com bisturi estéril em fragmentos de aproximadamente 1 cm cada, e logo após, inseridos em béquer contendo clorofórmio PA durante 1 hora. Em seguida, os fragmentos de cateter foram removidos cuidadosamente para não danificar a sua estrutura e foram então transferidos para três tubos falcon de 50 ml, um com água destilada estéril, que foi o controle do ensaio, um com uma solução de prometazina a 390 µg/mL e um com uma solução de 3906 µg/mL de prometazina. Os valores da impregnação são os valores da mediana das CIMs e 10 vezes esse valor, com base no estudo de Sidrim *et al*, 2019. Os fragmentos ficaram imersos nessas soluções por um período de 30 minutos.

Posteriormente, os fragmentos foram retirados dos tubos e armazenados em placas de Petri estéreis e levados à estufa por 12 horas para secarem. Outros fragmentos foram inseridos em tubos contendo caldo BHI e foram incubados por 24 horas a 37° C, sendo o controle de esterilidade do experimento. Após estarem totalmente secos, os cateteres foram levados à Central Analítica da UFC e foram analisados por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) para análise da estrutura dos cateteres.

4.8 Determinação da ação da prometazina impregnada em cateter sobre a formação de biofilme de *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis* e *Pseudomonas aeruginosa*

Para esse experimento, foram selecionadas duas cepas bacterianas de cada espécie estudada. Selecionamos uma ATCC e uma clínica para cada espécie, sendo a clínica sensível, resistente ou multirresistente. Para *Escherichia coli* foram selecionadas as cepas ECAT e ECAG, para *Klebsiella pneumoniae* foram selecionadas as KLAT e KL1S, para *Proteus mirabilis* foram PRAT e PRMR1 e para *Pseudomonas aeruginosa* as cepas com código PATCC e PAM1.

Inicialmente, foram adicionados 875 µL de BHI caldo enriquecido com 1% de glicose em cada poço da placa de 24 poços de fundo chato e adicionado inóculo bacteriano a 0,5 na escala de McFarland. Posteriormente, foram adicionados aos poços fragmentos de cateteres impregnados com prometazina e também fragmentos sem impregnação nenhuma, mas que

passaram pela etapa com clorofórmio como controle de crescimento. Esses fragmentos foram transferidos com auxílio de pinça estéril para não haver contaminação. Em seguida, a placa foi levada para estufa bacteriológica, por 48 horas, à temperatura de 37 °C.

Decorrido o tempo de incubação, as placas de 24 poços foram levadas à capela de fluxo laminar. Foi retirado o conteúdo das placas com auxílio de pipetador, e em seguida, foi adicionado 1mL solução salina 0,9% estéril e removida posteriormente duas vezes, para remoção das bactérias planctônicas. Após a lavagem, os fragmentos foram introduzidos em tubos falcon de 15 mL contendo 2 mL de solução salina estéril 0,9%. Os tubos foram levados ao vórtex e processados durante 1,5 minutos para desprendimento das células em biofilme para vida livre.

Após essa etapa, realizou-se diluições das amostras para posterior semeio em placa de Petri. Pipetou-se 100 µL do sobrenadante em um microtubo contendo 900 µL de salina estéril, diluindo 1:10 na amostra. Logo em seguida, foram retirados 100 µL dessa diluição e colocados em outro microtubo contendo 900 µL de salina estéril, gerando uma diluição de 1:100. Esse processo ocorreu mais duas vezes, gerando uma diluição final de 1:10.000. Ao final, depois de obter as quatro diluições, as duas últimas foram utilizadas para semeio, retirando 10 µL do conteúdo da diluição e semeando em placas de Petri (94x16mm) contendo ágar BHI e ágar CLED, para contagem de UFC de *P. mirabilis*. foi utilizada uma alça de Drigalski para semeio e foram incubadas em estufa bacteriológica por 24 horas a 37° C para crescimento das UFCs. Depois das 24 horas, as placas foram retiradas da estufa para contagem de colônias.

4.9 Avaliação da ação de antimicrobianos sobre biofilmes formados de *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis* e *Pseudomonas aeruginosa* em cateteres impregnados e não impregnados com prometazina

Para essa etapa, seguiu-se o mesmo protocolo da seção anterior, no entanto, foram adicionados aos poços contendo biofilmes maduros formados nos cateteres, soluções com meropenem ou ciprofloxacina nas concentrações referentes a CIM. Esse experimento foi realizado em duplicata. A organização da placa se deu da seguinte forma: os primeiros dois poços foram reservados para ser o controle do experimento, tendo apenas caldo BHI enriquecido com 1% de glicose com o inóculo bacteriano e o fragmento de cateter não impregnado, dois poços com o caldo BHI enriquecido com 1% de glicose, acrescido da CIM dos antimicrobianos para cada cepa bacteriana, do inóculo bacteriano e do fragmento

impregnado com prometazina e, por último, dois poços com caldo BHI enriquecido com 1% de glicose acrescido da CIM dos antimicrobianos para cada cepa, do inóculo bacteriano e do fragmento de cateter não impregnado. Em seguida, as placas foram incubadas em estufas bacteriológicas por 48 horas, à temperatura de 37° C para formação dos biofilmes. Passado esse período, foram quantificadas utilizando o mesmo protocolo da seção anterior.

4.10 Análise estatística

Os dados foram, inicialmente, analisados quanto à simetria. Em seguida, para avaliar o efeito do composto sobre a formação de biofilmes e sobre o biofilme maduro das cepas estudadas, bem como o efeito da impregnação de cateteres sobre a formação de biofilmes, utilizaram-se os testes t para amostras pareadas ou o teste de Wilcoxon para dados com distribuição não normal. Para todos os testes aplicados, valores de $P < 0,05$ permitiram tirar conclusões significativas.

5.0 RESULTADOS

5.1 Concentração Inibitória Mínima (CIM) de prometazina, ciprofloxacina e meropenem e Concentração de Erradicação Mínima sobre Biofilmes (CEMB) da prometazina contra cepas de *E. coli*, *K. pneumoniae*, *P. mirabilis* e *P. aeruginosa*

As CIMs variaram de 97,6 – 781,25 µg/mL contra *E. coli*, *K. pneumoniae*, *P. mirabilis* e *P. aeruginosa* (Tabela 2). A PMZ apresentou a mesma CIM (97,6 µg/mL) contra todos os isolados de *E. coli*. Para *Klebsiella pneumoniae* as CIMs variaram de 97,6 – 390,6 µg/mL. As CIMs da PMZ contra os isolados de *P. mirabilis* variaram de 390,6 - 781,25 µg/mL e para *P. aeruginosa* as CIM foram todas no valor de 781,25 µg/mL.

No tocante às CEMBs, a prometazina foi capaz de eliminar os biofilmes de todos os isolados de *E. coli* na concentração de 390,6 µg/mL, contra biofilmes de *K. pneumoniae* as CEMBs variaram de 781,25 - 1562,5 µg/mL, enquanto contra biofilmes de *P. mirabilis* e *P. aeruginosa* as CEMBs de PMZ apresentaram valores maiores, variando entre 781,25 - 3125 µg/mL. Os valores de CIM foram significativamente menores ($P < 0.05$) que os valores de CEMB.

As CIMs de ciprofloxacina para os isolados de *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis* e *Pseudomonas aeruginosa* variaram de 0,008 - >32 µg/mL e as CIMs de meropenem para as cepas do estudo variaram de 0,0625 - >16 µg/mL.

Tabela 2- Teste de sensibilidade planctônico (CIM) e em biofilme (CEMB) das espécies de *Escherichia coli* (n=5), *Klebsiella pneumoniae* (n=6), *Proteus mirabilis* (n=6) e *Pseudomonas aeruginosa* (n=6) para a prometazina e CIM das espécies estudadas para ciprofloxacina e meropenem.

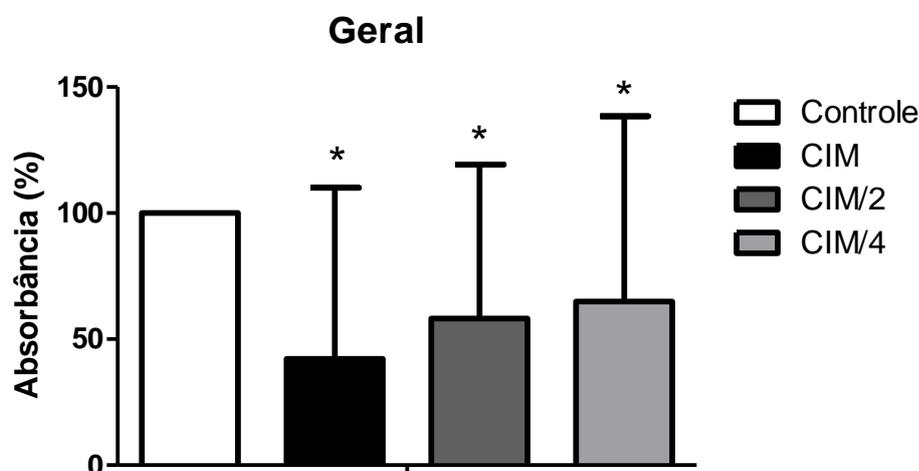
Isolados bacterianos	Código	Prometazina		CIP	MER
		CIM (µg/mL)	CEMB (µg/mL)	CIM (µg/mL)	CIM (µg/mL)
<i>Escherichia coli</i> ATCC	ECAT	97,6	390,6	0,008	0,0625
<i>Escherichia coli</i>	ECS5	97,6	390,6	>32	0,25
<i>Escherichia coli</i>	ECS8	97,6	390,6	0,03125	0,25
<i>Escherichia coli</i> enteroagregativa	EAEC	97,6	390,6	0,0625	0,125
<i>Escherichia coli</i>	EC2R	97,6	390,6	16	0,125
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC	KLAT	390,6	1562,5	0,25	0,125
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	KL1S	97,6	781,25	0,125	0,125
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	KL2S	97,6	1562,5	>32	0,125
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	KL1B	97,6	781,25	>32	>16

<i>Klebsiella pneumoniae</i>	KL2B	97,6	781,25	>32	0,125
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	KL2M	97,6	781,25	0,03125	0,25
<i>Proteus mirabilis</i> ATCC	PRAT	390,6	1562,5	0,03125	0,5
<i>Proteus mirabilis</i>	PRS1	390,6	781,25	0,03125	1
<i>Proteus mirabilis</i>	PRS4	390,6	1562,5	0,03125	1
<i>Proteus mirabilis</i>	PRS5	390,6	1562,5	0,5	1
<i>Proteus mirabilis</i>	PRMR1	390,6	781,25	16	1
<i>Proteus mirabilis</i>	PRMR2	781,25	1562,5	0,25	16
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC	PAATCC	781,25	3125,0	0,5	0,25
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	PAS1	781,25	1562,5	32	0,125
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	PAR1	781,25	1562,5	16	0,5
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	PAR4	781,25	1562,5	>32	0,25
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	PAR6	781,25	1562,5	1	16
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	PAM1	781,25	1562,5	>32	4

5.2 Ação do inibidor de bomba de efluxo prometazina sobre a formação de biofilmes de *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis* e *Pseudomonas aeruginosa*

As concentrações escolhidas foram as de CIM obtidas através do teste de sensibilidade, como mostra a **Tabela 2** e duas concentrações subinibitórias (CIM/2 e CIM/4). Conforme apresentado no **Gráfico 1**, a maior concentração utilizada reduziu significativamente ($P < 0,0001$) a biomassa dos biofilmes em formação em 57,8%, em relação ao controle de crescimento. Além disso, de maneira geral, as demais concentrações utilizadas também reduziram significativamente ($P < 0,0001$) a biomassa dos biofilmes em relação ao controle, com reduções de 41,5% e 37,3% na concentração intermediária e na menor concentração utilizada, respectivamente.

Gráfico 1- Ação da prometazina (PMZ) sobre a formação de biofilmes por bacilos Gram negativos associados à infecção do trato urinário. Dados expressos como média e desvio padrão da absorbância da biomassa, mensurada pela coloração com cristal violeta. * representam dados estatisticamente significantes.



O composto testado foi capaz de inibir a biomassa do biofilme de *E. coli* em todas as concentrações. Na concentração de CIM a prometazina foi capaz de reduzir a biomassa dos biofilmes formados em 67,5% (P: 0,0008). Na concentração de CIM/2 a diminuição obtida pela prometazina é de 65,2% (P: 0,0024). E na menor concentração (CIM/4) a redução apresentada é de 26,5%. Somente nas duas maiores concentrações as reduções foram significativas (**Gráfico 2**).

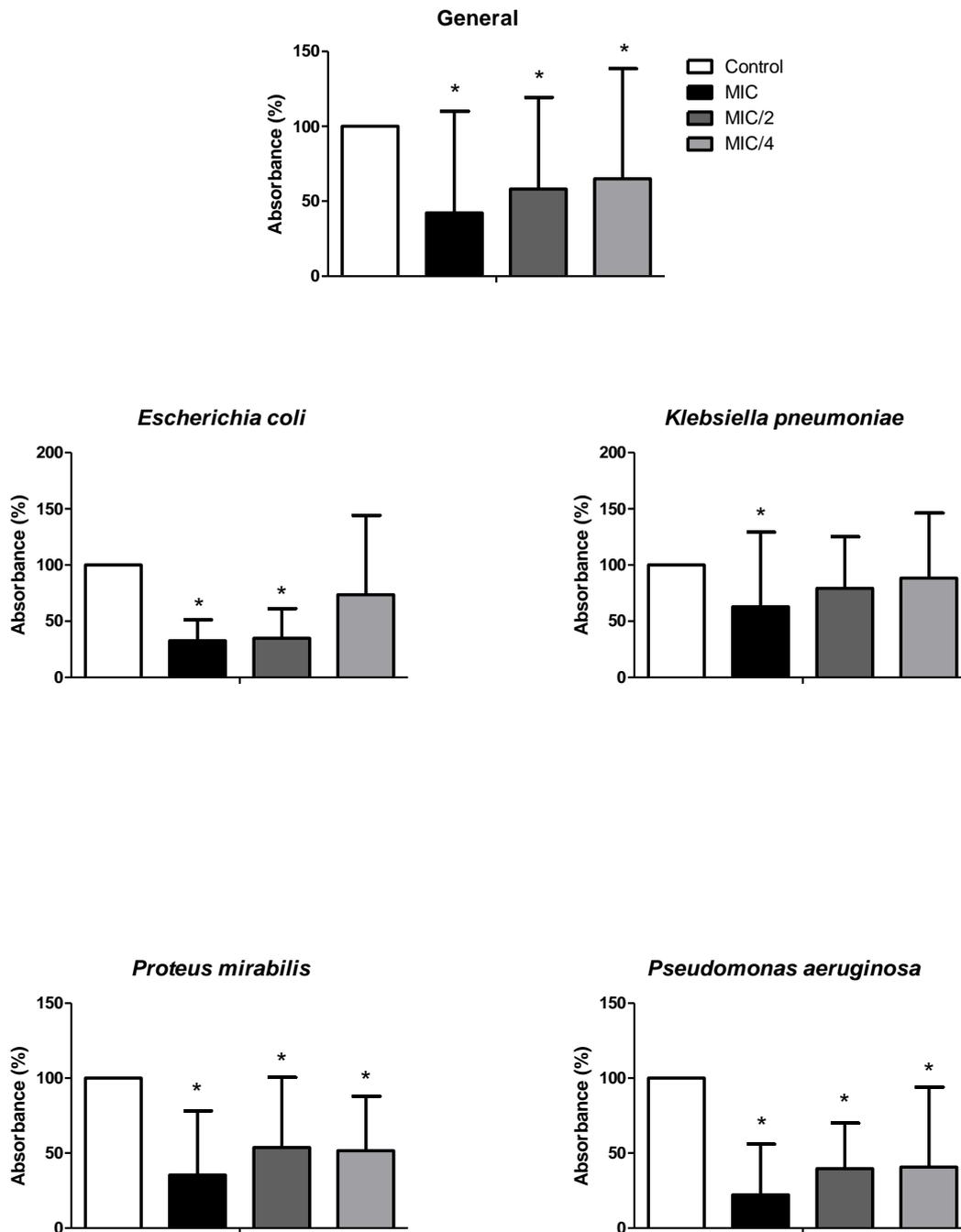
Para isolados de *K. pneumoniae*, a prometazina mostrou uma redução significativa na concentração de CIM com uma redução de 37,2% (P: 0,0059). Nas demais concentrações CIM/2 e CIM/4 as reduções foram de 20,7% e 11,7% na biomassa do biofilme, respectivamente, em comparação com os controles de crescimento (**Gráfico 2**).

Isolados de *Proteus mirabilis* apresentaram reduções significativas (P<0,05) na biomassa dos biofilmes em todas as concentrações testadas (MIC, MIC/2 e MIC/4). Na maior concentração a redução da biomassa dos biofilmes foi significativa (P<0,0001) de 64,6%. Na concentração intermediária a redução foi estatisticamente relevante (P<0,0001) com 46,3% e na menor concentração de prometazina a redução foi de 48,5% (P<0,0001) em relação aos controles de crescimento (**Gráfico 2**).

O efeito da prometazina na formação de biofilme de isolados de *Pseudomonas aeruginosa* foi capaz de ser significativamente reduzido (P<0,0001) em todas as

concentrações testadas, incluindo MIC, MIC/2 e MIC/4 com 77,8%, 60,5% e 59,3%, respectivamente (**Gráfico 2**).

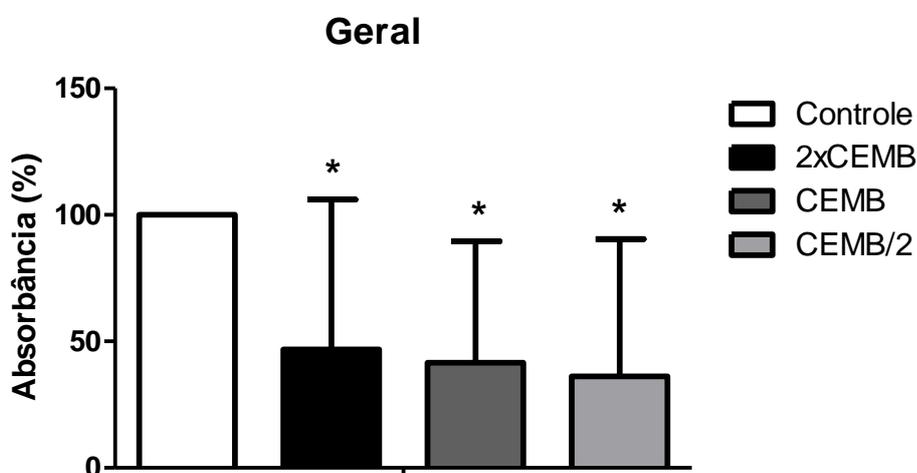
Gráfico 2 - Ação da prometazina (PMZ) sobre a formação de biofilmes por *Escherichia coli* (n=5), *Klebsiella pneumoniae* (n=6), *Proteus mirabilis* (n=6) e *Pseudomonas aeruginosa* (n=6). Dados expressos como média e desvio padrão da absorbância da biomassa, mensurada pela coloração com cristal violeta. * representam dados estatisticamente significantes.



5.3 Ação do inibidor de bomba de efluxo prometazina sobre biofilmes maduros de *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis* e *Pseudomonas aeruginosa*

De modo geral, a prometazina foi capaz de reduzir significativamente ($P < 0,0005$) a biomassa dos biofilmes de bacilos Gram negativos em todas as concentrações testadas. A diminuição da biomassa dos biofilmes maduros foi de 63,8% na menor concentração testada (CEMB/2) quando comparados ao controle de crescimento. Na segunda maior concentração (CEMB), a diminuição da biomassa dos biofilmes proporcionada pela prometazina foi de 58,4%. Na maior concentração testada, a redução foi de 53,2% quando comparados ao controle (**Gráfico 3**).

Gráfico 3- Ação da prometazina (PMZ) sobre biofilmes maduros de bacilos Gram negativos associados à infecção do trato urinário. Dados expressos como média e desvio padrão da absorbância da biomassa, mensurada pela coloração com cristal violeta. * representam dados estatisticamente significantes.



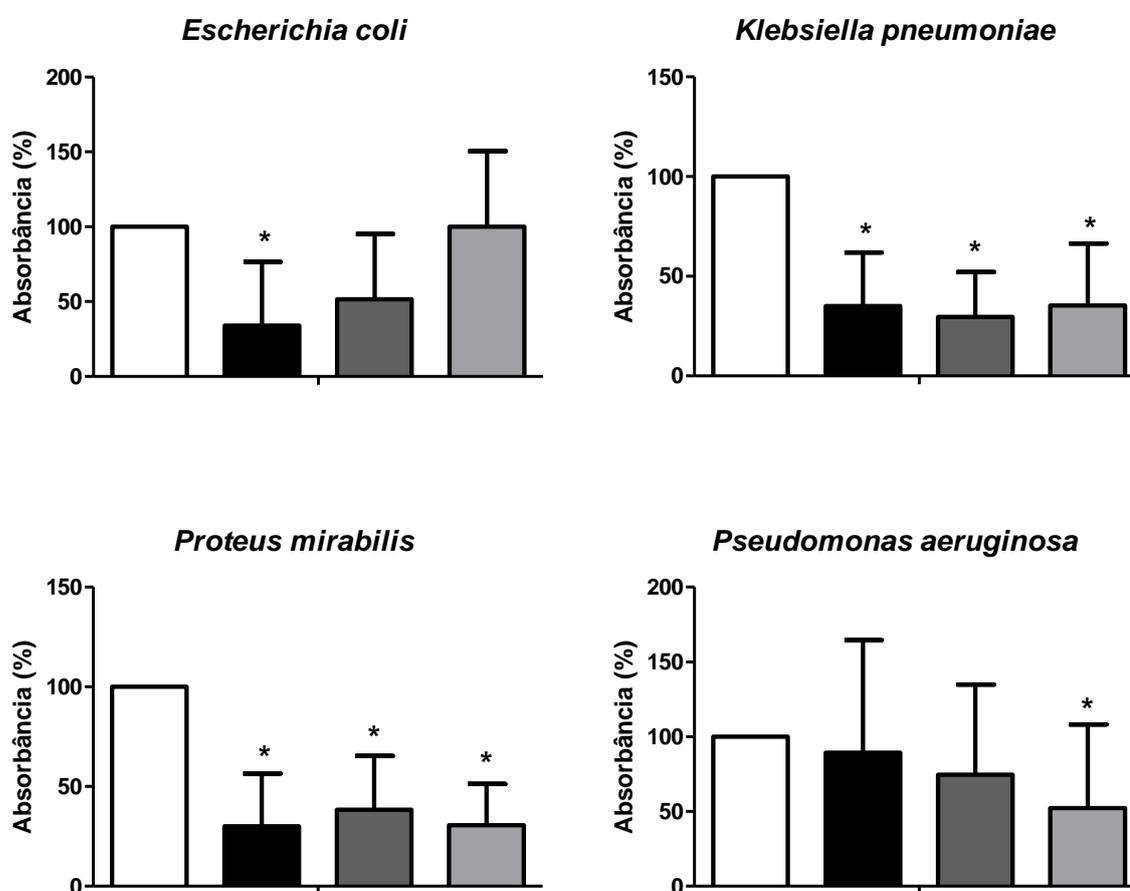
A prometazina nas duas menores concentrações testadas (CEMB/2 e CEMB), não foi capaz de reduzir significativamente a biomassa dos biofilmes de *Escherichia coli*. Porém na concentração de 2xCEMB a redução foi significativa ($P > 0,05$) com 66%.

Para os isolados da espécie de *Klebsiella pneumoniae* a redução foi significativa ($P > 0,0001$) em todas as concentrações testadas de prometazina. Na menor concentração a redução foi de 64,6% na biomassa dos biofilmes maduros. Na concentração intermediária, a redução gerada pela prometazina foi de 70,3% quando comparado ao controle. E na maior concentração testada, a redução da biomassa foi de 65% em relação ao controle.

Analisando a espécie de *Proteus mirabilis*, as concentrações de CEMB/2, CEMB e 2xCEMB para prometazina foram capazes de reduzir significativamente ($P>0,001$) a biomassa dos biofilmes maduros em 69,5%, 61,6% e 69,9%, respectivamente.

Para as cepas de *Pseudomonas aeruginosa*, o resultado se apresentou divergente das demais espécies estudadas. Nas duas maiores concentrações de prometazina testadas não houve redução significativa na biomassa dos biofilmes, somente na concentração de CEMB/2 houve redução estatisticamente relevante ($P>0,05$), com 47,8% de diminuição na biomassa dos biofilmes.

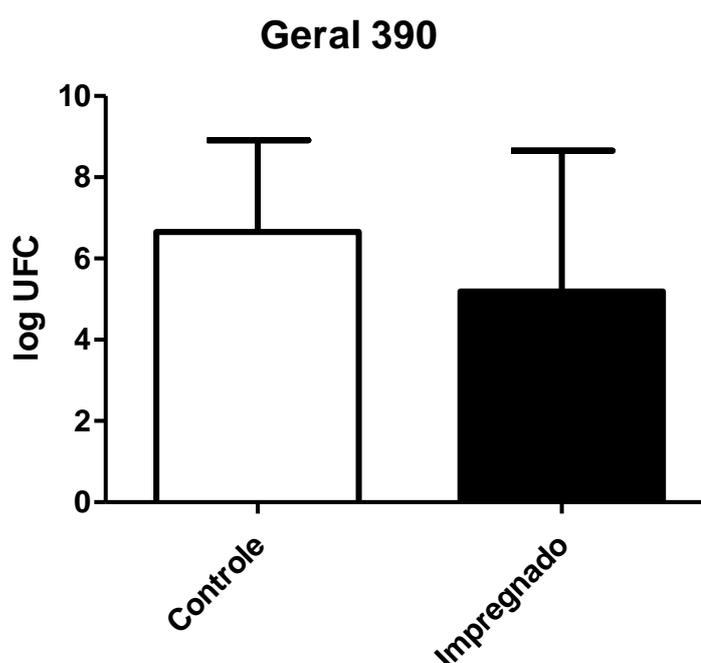
Gráfico 4 - Ação da prometazina (PMZ) sobre biofilmes maduros de *Escherichia coli* (n=5), *Klebsiella pneumoniae* (n=6), *Proteus mirabilis* (n=6) e *Pseudomonas aeruginosa* (n=6). Dados expressos como média e desvio padrão da absorbância da biomassa, mensurada pela coloração com cristal violeta. * representam dados estatisticamente significantes.



5.4 Ação da prometazina (390 $\mu\text{g/mL}$) impregnada em cateter sobre a formação de biofilmes de *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis* e *Pseudomonas aeruginosa*

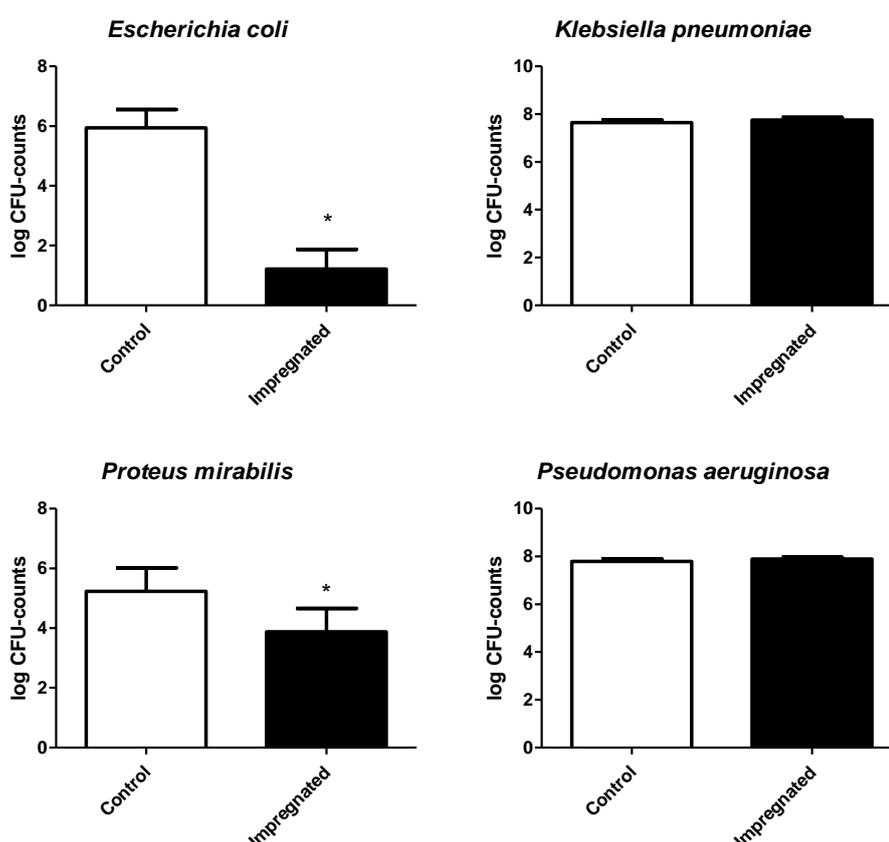
No ensaio com fragmentos de cateter impregnados com prometazina a uma concentração de 390,6 $\mu\text{g/mL}$, de modo geral, não apresentou redução significativa quando comparados ao controle do experimento (**Gráfico 5**).

Gráfico 5- Efeito da impregnação de cateteres vesicais de demora com prometazina (390 $\mu\text{g/mL}$) sobre a formação de biofilmes de bacilos Gram negativos. Dados expressos como média e desvio padrão da contagem de UFCs por cateter.



Analisando individualmente, os isolados de *E. coli* e *P. mirabilis*, apresentaram uma redução significativa de 4 log ($P < 0,0005$) e 1 log ($P < 0,05$), respectivamente nos cateteres impregnados quando comparados aos cateteres não impregnados (**Gráfico 6**). Entretanto, para os isolado de *K. pneumoniae* e *P. aeruginosa* não apresentaram diferenças estatisticamente relevantes em relação ao controle.

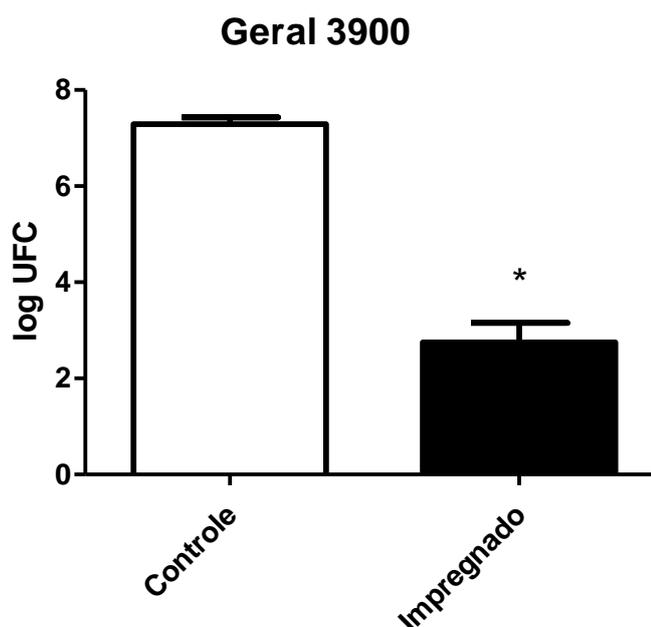
Gráfico 6- Efeito da impregnação de cateteres vesicais de demora com prometazina (390,6 µg/mL) sobre a formação de biofilmes de *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis* e *Pseudomonas aeruginosa*. Dados expressos como média e desvio padrão da contagem de UFCs por cateter. * representam dados estatisticamente significantes.



5.5 Ação da prometazina (3900 µg/mL) impregnada em cateter sobre a formação de biofilmes de *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis* e *Pseudomonas aeruginosa*

O ensaio com fragmentos de cateter impregnados com prometazina a concentração de 3900 µg/mL demonstrou de modo geral, uma redução significativa ($P < 0,0001$) nas unidades formadoras de colônias quando comparados ao cateter sem impregnação, com diminuição de 5 log nas UFCs quando comparadas ao controle de crescimento (**Gráfico 7**).

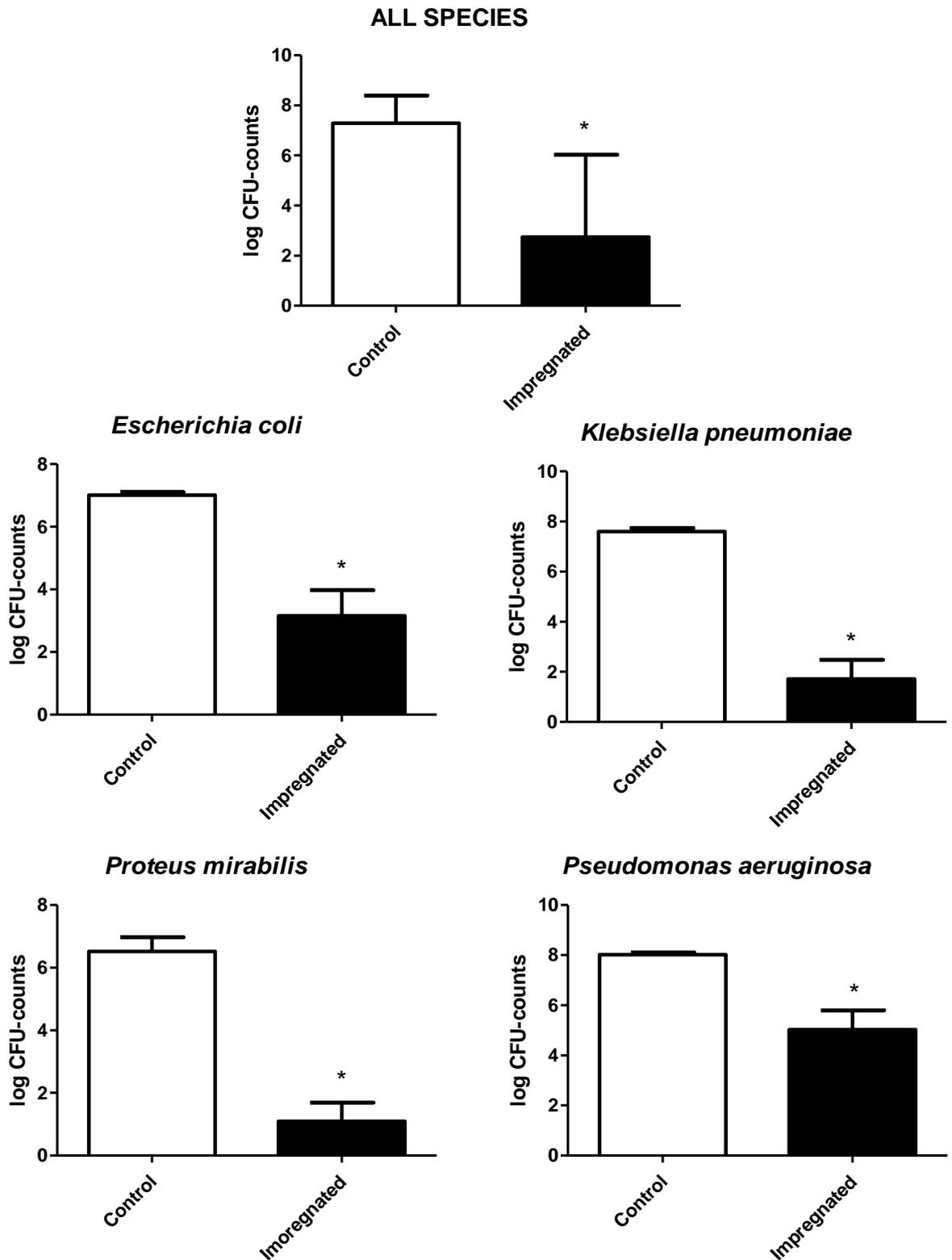
Gráfico 7- Efeito da impregnação de cateteres vesicais de demora com prometazina (3900 µg/mL) sobre a formação de biofilmes de bacilos Gram negativos. Dados expressos como média e desvio padrão da contagem de UFCs por cateter. * representam dados estatisticamente significantes.



Analisando por espécie separadamente, os cateteres impregnados com prometazina foram capazes de reduzir as UFC's significativamente ($P < 0,0001$) em todas as espécies estudadas. O cateter impregnado diminuiu as UFCs dos isolados de *Escherichia coli* em 4 log em comparação com o cateter sem impregnação. Para *Klebsiella pneumoniae* o cateter impregnado com prometazina reduziu em 6 log as UFCs do cateter em comparação com o controle. O cateter impregnado reduziu as UFCs em 5 log para a espécie de *Proteus mirabilis*. E para *Pseudomonas aeruginosa* a redução gerada pelo cateter impregnado foi de 3 log em comparação com o controle. Todas as espécies apresentaram reduções superiores a 80% nas UFC's em cateteres impregnados com prometazina a 3900 µg/mL quando comparados ao controle de crescimento do experimento.

Gráfico 8- Efeito da impregnação de cateteres vesicais de demora com prometazina (3900 µg/mL) sobre a formação de biofilmes de *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus*

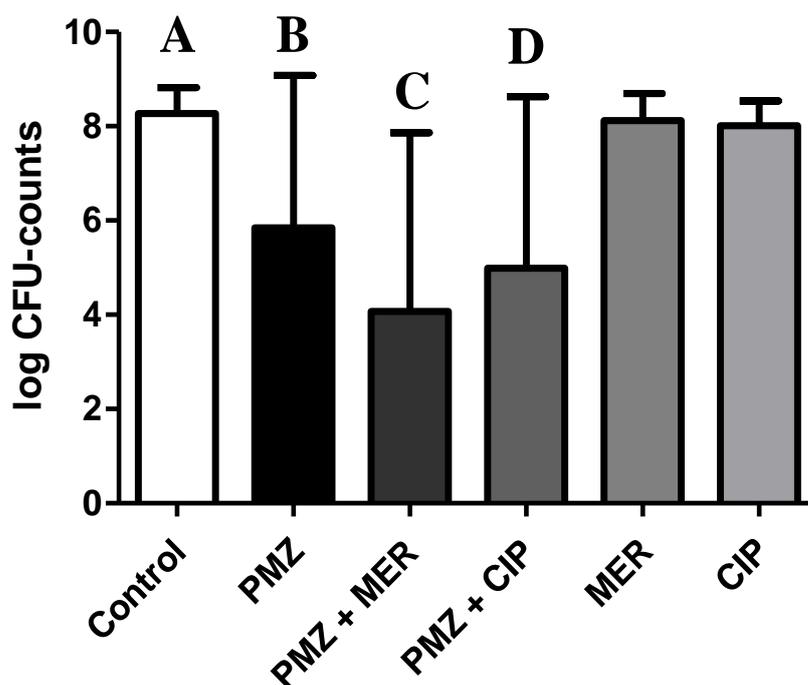
mirabilis e *Pseudomonas aeruginosa*. Dados expressos como média e desvio padrão da contagem de UFCs por cateter. * representam dados estatisticamente significantes.



5.6 Efeito dos antimicrobianos ciprofloxacina e meropenem em cateteres impregnados e não impregnados com prometazina sobre biofilmes de *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis* e *Pseudomonas aeruginosa*

Biofilmes formados sobre cateteres impregnados com prometazina (B) e aqueles formados sobre cateteres impregnados e expostos aos antimicrobianos ciprofloxacina (D) e meropenem (C) obtiveram redução significativa ($P < 0.0001$) dos biofilmes aderidos aos cateteres, quando comparados ao controle de crescimento (A), com reduções de 2, 4 e 3 log de UFCs respectivamente. Analisando o efeito dos cateteres impregnados com prometazina (B) em associação com os antimicrobianos ciprofloxacina (D) e meropenem (C) não é obtido resultado significativo, apesar de apresentar uma redução no log de UFC. Os cateteres impregnados com prometazina em associação com antimicrobianos (C e D) quando comparados com os cateteres sem impregnação em associação com os antimicrobianos (E) possuem reduções significativas ($P < 0.0001$) no log de UFCs, com reduções superiores a 3 log de UFC.

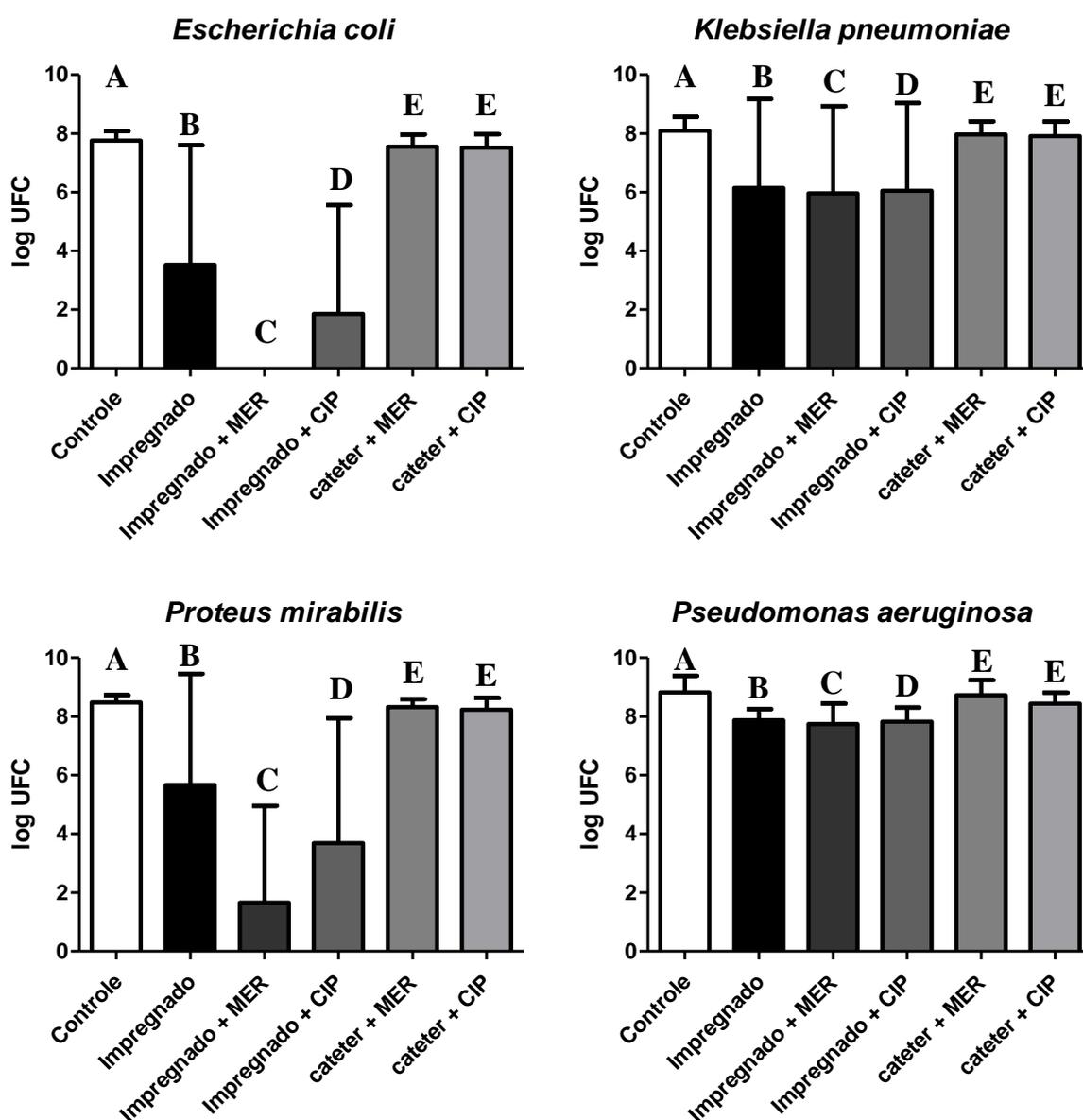
Gráfico 9- Efeito de ciprofloxacina (CIP) e meropenem (MER) sobre biofilmes maduros de *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis* e *Pseudomonas aeruginosa* formados em cateteres impregnados e não impregnados com prometazina. Dados expressos como média e desvio padrão da contagem de UFCs por cateter.



Os cateteres impregnados com prometazina (B) em associação com os antimicrobianos (C e D) obtiveram resultados significativos de ação sinérgica antimicrobiana

entre os fármacos somente quando submetidos os isolados das espécies de *Escherichia coli* e *Proteus mirabilis*. Além disso, os biofilmes formados em cateter das duas espécies supracitadas obteve resultados significativos quando comparados os cateteres sem impregnação (A) com os cateteres impregnados com prometazina (B). Nas espécies de *Klebsiella pneumoniae* e *Pseudomonas aeruginosa* é possível observar redução nos biofilmes formados em cateteres impregnados com prometazina de 1 log, porém os valores de UFCs são altos.

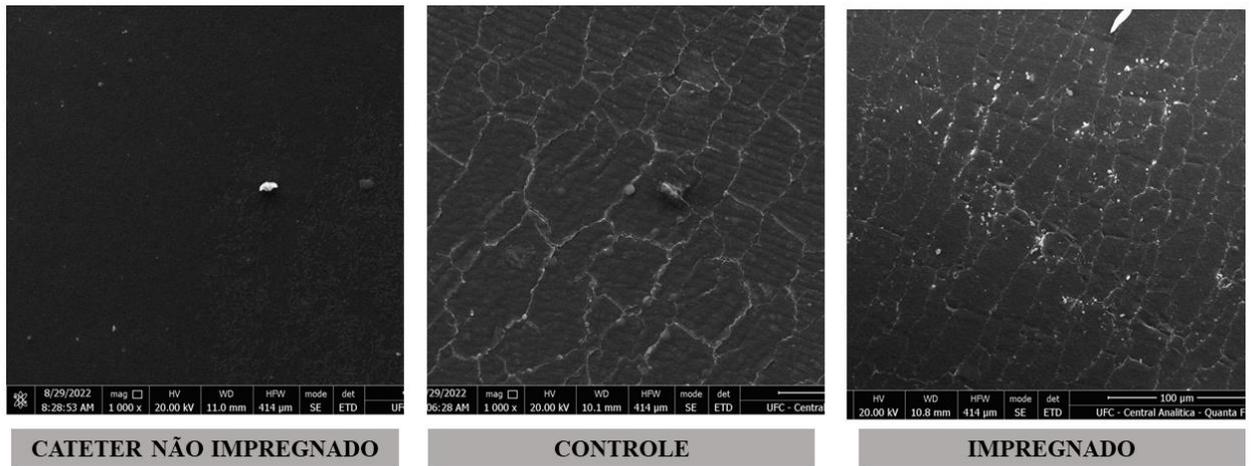
Gráfico 10- Efeito de ciprofloxacina (CIP) e meropenem (MER) sobre biofilmes por espécies de *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis* e *Pseudomonas aeruginosa* formados em cateteres impregnados e não impregnados com prometazina. Dados expressos como média e desvio padrão da contagem de UFCs por cateter.



5.7 Análise por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) dos cateteres

Os fragmentos de cateteres impregnados com prometazina foram encaminhados para análise na Central Analítica da UFC. Nas imagens obtidas com o MEV, é possível notar uma diferença na superfície dos cateteres que não foram submetidos à impregnação, que possuem uma estrutura lisa. Os cateteres impregnados e o controle que sofreram ação do clorofórmio no processo de impregnação apresentam superfície com rugosidades em comparação com o não impregnado (Figura 8).

Figura 8 – Imagens obtidas por MEV dos fragmentos de cateter impregnados, não impregnados e submetidos ao processo de impregnação sem droga.



6.0 DISCUSSÃO

Num cenário mundial de patógenos resistentes a antimicrobianos de várias classes farmacológicas e de grande espectro, o redirecionamento farmacológico é uma alternativa para o enfrentamento, uma vez que antimicrobianos de uso comum geram pressão seletiva e proporcionam condições para a evasão da ação de fármacos. Nessa perspectiva, a prometazina apresenta propriedades capazes de inibir bombas de efluxo, mecanismo importante na resistência bacteriana e na dinâmica de formação e manutenção de biofilmes. Dessa forma, o uso de cateteres impregnados com prometazina pode ser uma estratégia importante na superação de mecanismos de resistência a antimicrobianos e auxiliar no controle de biofilmes microbianos em dispositivos médicos (CHAN; ONG; CHUA, 2007; SIDRIM et al, 2016).

O biofilme com todos os seus componentes, matriz externa de polissacarídeo, sistema de quorum sensing e as bombas de efluxo conferem maior proteção e resistência a agentes estressores do que em estilo de vida planctônico (ROY et al., 2018). Isso é expresso em nossos resultados, uma vez que as CEMBs encontradas para a prometazina foram superiores às CIMs encontradas contra a forma planctônica, chegando a uma concentração 16 vezes maior, corroborando o conhecimento de que biofilmes são até 1000 vezes menos sensíveis a antimicrobianos que bactérias na forma planctônica (WU et al., 2015).

Além da variação entre planctônica e biofilme, os valores obtidos na sensibilidade para ambas as formas apresentaram resultados distintos não só entre espécies, mas também interespecies, corroborando com o fato de serem isolados clínicos diferentes com perfis de sensibilidade distintos. Ademais, os valores de CIMs de prometazina contra isolados de *Pseudomonas aeruginosa* foram os maiores observados. Esse dado vai em consonância com o fato de a espécie *Pseudomonas aeruginosa* ser a que possui maior arsenal de resistência antimicrobiana entre as espécies estudadas e possuir uma superexpressão de bombas de efluxo quando comparadas às demais cepas do estudo, dessa forma, é esperado que a prometazina apresente os maiores valores de CIM e CEMB contra essa espécie (PEREIRA; ROSA; CARDOSO, 2015).

A alta atividade de bombas de efluxo em biofilmes justifica-se pois elas auxiliam na resistência bacteriana fazendo extrusão de substâncias danosas ao microrganismo e facilitam a coordenação do *quorum sensing* importante na formação da matriz do biofilme (ALAV; SUTTON; RAHMAN, 2018). Os inibidores de bombas de efluxo são descritos como capazes de reduzir de forma significativa a formação de biofilmes bacterianos, com ação variável entre espécies distintas (REZA; SUTTON; RAHMAN, 2019). O inibidor de bombas de efluxo PMZ reduziu a biomassa de todos os biofilmes de bacilos Gram negativos estudados em todas as concentrações utilizadas. Os isolados de *Pseudomonas aeruginosa* foram os

responsáveis pelas maiores reduções na biomassa na formação de biofilmes, isso se deve, provavelmente, pela inibição das bombas de efluxo que são intensamente expressas pela espécie, representando seu principal fator de virulência (PAN et al., 2016). Os achados encontrados corroboram aqueles de Zahedani (2021), que evidenciou maior presença de genes associados à atividade de bombas de efluxo em cepas *P. aeruginosa* forte formadoras de biofilme.

De forma isolada, a ação da prometazina sobre biofilmes maduros dos diferentes isolados testados foi distinta. O composto foi capaz de reduzir a biomassa dos biofilmes de *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* e *Proteus mirabilis* em, no mínimo, duas das concentrações experimentadas, quando comparado ao controle. Esse fato corrobora com o estudo de Sidrim et al. (2019) que testou um inibidor de bombas de efluxo, clorpromazina, pertencente à mesma família farmacológica da prometazina sobre isolados bacterianos das espécies supracitadas e que também apresentou redução na biomassa de biofilmes maduros em uma das concentrações testadas.

A espécie *Escherichia coli* é a principal bactéria causadora de infecções do trato urinário, desse modo, os resultados da sensibilidade dos isolados dessa espécie contra a ação da prometazina são animadores, visto que *Escherichia coli* apresentou as menores concentrações para a prometazina tanto na forma planctônica quanto na forma de biofilme (WEINER-LASTINGER et al, 2020).

A impregnação com cateteres com prometazina se deu inicialmente com a concentração de mediana obtida através da MIC da sensibilidade dos microrganismos estudados. Porém, a impregnação com 390 µg/mL não apresentou resultados significativos, principalmente contra as cepas de *Klebsiella pneumoniae* e *Pseudomonas aeruginosa*. Dessa forma, a concentração da impregnação foi aumentada 10 vezes do seu valor inicial segundo a metodologia de SIDRIM., et al, 2019. Com a concentração de 10x a mediana, os resultados de redução de UFC's por cateter foi significativo para todas as espécies do experimento.

Os cateteres vesicais impregnados com substâncias antimicrobianas possuem a capacidade de reduzir a formação de biofilmes relacionadas ao uso de dispositivo médico em até 47% (LEDERER; JARVIS; THOMAS; RITTER, 2014). Diante disso, a redução da biomassa dos biofilmes por prometazina é mais evidente nos biofilmes em formação quando comparados aos biofilmes maduros, uma vez que a estratégia da impregnação de cateteres é uma medida com foco na prevenção de biofilmes associados a infecção do trato urinário.

Os cateteres impregnados com prometazina obtiveram resultados promissores tanto na impregnação de forma isolada quando em associação com antimicrobianos clássicos

(ciprofloxacina e meropenem). Drogas inibidoras de bombas de efluxo são capazes de aumentar a suscetibilidade de bactérias resistentes aos antimicrobianos antes pouco efetivos e assim favorecer o tratamento de infecções (FIAMEGOS, et al, 2011).

A impregnação de fragmentos de cateter vesical com prometazina se mostrou efetiva na redução da formação de biofilmes sobre a estrutura da sonda. A impregnação com prometazina, composto que não pertence a classe de antimicrobianos, reduz a pressão seletiva gerada por cateteres impregnados com substâncias antimicrobianas que pode favorecer o desenvolvimento de cepas resistentes pelo contato contínuo do microrganismo com o cateter (JOHNSON; JOHNSTON; KUSKOWSKI, 2012). Além disso, os cateteres são dispositivos muito aplicados na assistência médica para pacientes internados ou até mesmo pacientes em cuidados domiciliares, e seu uso pode propiciar condições para infecção do trato urinário associada ao uso de cateter (MENEGUETI, et al, 2019). Dessa forma, o uso de cateteres vesicais impregnados com prometazina é uma alternativa promissora no enfrentamento de infecções associadas a biofilmes em cateteres urinários.

7.0 CONCLUSÃO

A partir desse estudo foi possível observar que:

A prometazina possui efeito de inibir a formação de biofilmes e desestruturar biofilmes maduros de *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis* e *Pseudomonas aeruginosa*.

Concluimos que a prometazina impregnada em cateter vesical de demora é capaz de inibir a formação de biofilmes sobre a superfície do cateter e de potencializar a ação dos antimicrobianos ciprofloxacina e meropenem para as espécies de *Escherichia coli* e *Proteus mirabilis*.

Apesar de mudar a superfície do cateter, a impregnação com prometazina é efetiva na diminuição de biofilmes bacterianos aderidos em cateteres.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABISADO, R.G.; BENOMAR, S.; KLAUS, R.; DANDEKARAND, A.A.; CHANDLER, J.R. Bacterial Quorum Sensing and Microbial Community Interactions. **MBio**, v. 9, n. 3, p. e02331-17, 2018.

AGUILAR-VEJA, L. *et al.* Antibacterial properties of phenothiazine derivatives against multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* strains. **J Appl Microbiol**, v. 131, n. 5, p. 2235-2243, 2021.

ALAV, I.; SUTTON, J. M.; RAHMAN, K. M. Role of bacterial efflux pumps in biofilm formation. **J Antimicrob Chemother**, v. 73, n. 8, p. 2003-2020, 2018.

ARMBRUSTER, C. E.; MOBLEY, H. L. T. Pearson MM. Pathogenesis of *Proteus mirabilis* Infection. **EcoSal Plus.**, v. 8, n. 1, 2018.

BANDARA, H.M.H.N.; MATSUBARA, V.H.; SAMARANAYAKE, L.P. Future therapies targeted towards eliminating *Candida* biofilms and associated infections. **Expert Review of Anti-infective Therapy**, v.15, p. 299-318, 2016.

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

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Medidas de Prevenção de Infecção Relacionada à Assistência à Saúde. Brasília: **ANVISA**, 2017.

BRAUNER, A.; FRIDMAN, O.; GEFEN, O.; BALABAN, N. Q. Distinguishing between resistance, tolerance and persistence to antibiotic treatment. **Nat Rev Microbiol.**, v. 14, n. 5, p.320-330, 2016.

BRILHANTE, R. S. N. *et al.* In vitro effects of promethazine on cell morphology and structure and mitochondrial activity of azole-resistant *Candida tropicalis*. **Med Mycol**, v. 56, n. 8, p. 1012-1022, 2018.

BRILHANTE, R. S. N. *et al.* Antifungal activity of promethazine and chlorpromazine against planktonic cells and biofilms of *Cryptococcus neoformans/Cryptococcus gattii* complex species. **Med Mycol**, v. 58, n. 7, p. 906-912, 2020.

CHANG, C. *et al.* Bacteriophage-Mediated Control of Biofilm: A Promising New Dawn for the Future. **Front Microbiol**, v. 4, n. 13, p.825-828, 2007.

CANTISANI, C. *et al.* Topical promethazine side effects: our experience and review of the literature. **BioMed Research International**. v. 2013, p. 1-9, 2013.

CASTELO-BRANCO, D. S, *et al.* Azole-resistant *Candida albicans* from a wild Brazilian porcupine (*Coendou prehensilis*): a sign of an environmental imbalance? **Med Mycol**, v. 51, n.5, p. 555-560, 2013.

CASTELO-BRANCO, D.S., *et al.* Farnesol increases the susceptibility of *Burkholderia pseudomallei* biofilm to antimicrobials used to treat melioidosis. **J Appl Microbiol**, v. 120, n. 3, p. 600-606, 2016.

CHAN, Y.Y.; ONG, Y. M.; CHUA, K. I. Synergistic Interaction Between Phenothiazines and Antimicrobial Agents Against *Burkholderia Pseudomallei*. **Antimicrob Agents Chemother.** , v. 51, n. 2, p. 623-30, 2007.

CHENOWETH, C. E.; GOULD, C. V, SAINT, S. Diagnosis, management, and prevention of catheter-associated urinary tract infections. **Infect Dis Clin North Am**, v. 28, n. 1, p. 105-119, 2014.

CHEW, R. *et al.* Large urate cystolith associated with *Proteus* urinary tract infection. **Kidney Int.**, v. 81, n.8, p. 802, 2012.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Standards M02-A12, M07-A10, and M11-A8; 27th ed. CLSI M100-S27. **Clinical and Laboratory Standards Institute**, Wayne, PA. 2022.

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

COMSTAT. **Microbiol**, v. 10, n. 14, p. 2395-2407, 2000.

DIELUBANZA, E. J.; SCHAEFFER, A. J. Urinary Tract Infections in Women. **Med Clin North Am**, v. 95, n. 1, p. 27-41, 2011

ERCOLE, F. F. *et al.* Integrative review: evidences on the practice of intermittent/indwelling urinary catheterization. **Rev Lat Am Enfermagem**, v. 21, n. 1, p. 459-468, 2013.

ETO, D. S.; SUNDSBAK, J. L.; MULVEY, M. A. Actin-gated intracellular growth and resurgence of uropathogenic *Escherichia coli*. **Cell Microbiol** , v. 8, n. 4, p. 704-717, 2006.

FENELEY, R. C.; HOPLEY, I. B., WELLS, P. N. Urinary Catheters: History, Current Status, Adverse Events and Research Agenda. **J Med Eng Technol** , v. 39, n. 8, p. 459-70, 2015.

FIALLOS, N. M, *et al.* The Potential of Phenothiazines against Endodontic Pathogens: A Focus on *Enterococcus-Candida* Dual-Species Biofilm. **Antibiotics**, v. 11, n. 11, p. 1562, 2022.

FIAMEGOS, Y. C. *et al.* Antimicrobial and efflux pump inhibitory activity of caffeoylquinic acids from *Artemisia absinthium* against gram-positive pathogenic bacteria. **PLoS One**, v. 4, n. 4, 2011.

FLORES- MIRELES, A. L. *et al.*, Urinary tract infections: epidemiology, mechanisms of infection and treatment options. **Nat Rev Microbiol.**, v. 13, n. 5, p. 269-84, 2015.

FOLLADOR, R. *et al.* The diversity of *Klebsiella pneumoniae* surface polysaccharides. **Microb Genom.**, v. 2, n. 8, 2016.

FRIEDLAENDER, C. Ueber die Schizomyceten bei der acuten fibrösen Pneumonie . Archiv Patholog. Anat. Physiol. **Klinische Med.**, v. 87, p. 319-324, 1882.

GAUHAR, V., et al. Catheter-Associated Urinary Infections and Consequences of Using Coated versus Non-Coated Urethral Catheters-Outcomes of a Systematic Review and Meta-Analysis of Randomized Trials. **J Clin Med**, v.11, n. 15, 2022.

GRIFFITH, D. P.; MUSHER, D. M.; ITIN, C. Urease. The primary cause of infection-induced urinary stones. **Invista Urol.**, v. 13, n. 5, p. 346-50, 1976.

Hanafy HM, Saad SM, Al-Ghorab MM Early arabian medicine: contribution to urology. **Urology**, n. 4, p. 114-120, 1974.

HAUSER, A. R. *Pseudomonas Aeruginosa*: So Many Virulence Factors, So Little Time. **Crit Care Med.**, v. 39, n. 9, p. 2193-94, 2011.

HICKLING, D. R.; SUN, T. T.; WU, X. R. Anatomy and Physiology of the Urinary Tract: Relation to Host Defense and Microbial Infection. **Microbiol Spectr**, v. 3, n. 4, 2015.

JACOBSEN, S. M. et al., Complicated catheter-associated urinary tract infections due to *Escherichia coli* and *Proteus mirabilis*. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 21, n. 1, p. 26–59, 2008.

KRANZ, J.; SCHMIDT, S.; WAGENLEHNER, F.; SCHNEIDEWIND, L. Catheter-Associated Urinary Tract Infections in Adult Patients. **Dtsch Arztebl Int.** v. 117, n. 6, p. 83-88, 2020.

LAWRENCE, E. L.; TURNER, I. G. Kink, propriedades de fluxo e retenção de cateteres urinários parte 1: cateteres de Foley convencionais. **Journal of Materials Science**, v. 17, p. 147-152, 2006.

LEDERER, J. W.; JARVIS, W. R.; THOMAS, L.; RITTER J. Multicenter cohort study to assess the impact of a silver-alloy and hydrogel-coated urinary catheter on symptomatic catheter-associated urinary tract infections. **J Wound Ostomy Continence Nurs**, v. 41, n. 5, p. 473, 2014.

LISTER, P. D.; WOLTER, D. J.; HANSON, N. D. Antibacterial-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: clinical impact and complex regulation of chromosomally encoded resistance mechanisms. *Clin Microbiol Rev.*, v. 22, n. 4, p. 582-61, 2009.

MAGILL, S. S., et al. Multistate point-prevalence survey of health care-associated infections. **N Engl J Med**, v. 370, n. 13, p. 1198-1208, 2014.

MATTHEWS, S. J.; LANCASTER, J. W. Urinary tract infections in the elderly population. **Am J Geriatr Pharmacother**, v. 9, n.5, p. 286-309, 2011.

MENEGUETI, M. G. *et al.* Long-term prevention of catheter-associated urinary tract infections among critically ill patients through the implementation of an educational program and a daily checklist for maintenance of indwelling urinary catheters: A quasi-experimental study. **Medicine (Baltimore)**, v. 98, n. 8, 2019.

MIELKO, K. A. et al. Metabolomic studies of *Pseudomonas aeruginosa*. **Mundo J Microbiol Biotechnol.**, v. 35, n. 11, p. 178, 2019.

MITSUCHASHI; M.; PAYAN, D. G. Molecular and cellular analysis of histamine H1 receptors on cultured smooth muscle cells. **J Cell Biochem**, v. 40, n. 2, p. 183-192, 1989

MOBLEY, H. L. T. *Proteus mirabilis* Overview. **Methods Mol Biol.**, v. 2021, p. 1-4, 2019.

MORATO, E. P. et al. Domestic cats constitute a natural reservoir of human enteropathogenic *Escherichia coli* types. **Zoonoses Public Health.**, v. 56, n. 5, p. 229-37, 2009.

MOTA, E. C; OLIVEIRA, A. C. Catheter-associated urinary tract infection: why do not we control this adverse event? **Rev Esc Enferm**, v. 30, n.53, 2019.

MUNOZ - PRICE, L. S. et al. Clinical epidemiology of the global expansion of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemases.. **Lancet Infect Dis** ., v. 13, n. 9, p. 785-9, 2013.

NICOLLE, L. E. Catheter associated urinary tract infections. **Antimicrob Resist Infect Control**. v. 3, n. 23., 2014.

NACEY, J; DELAHUNT, B. The evolution and development of the urinary catheter. **Aust N Z J Surg**, v. 63, n. 10, p. 815-819, 1993.

OPOKU-TEMENG, C.; KOBAYASHI, S. D.; DELEO, F. R. Cápsula de *Klebsiella pneumoniae* polissacarídeo como alvo para terapêuticas e vacinas. **Comput Struct Biotechnol J**. 2019; 17: p. 1360- 66, 2019.

O'HARA, C. M., BRENNER, F. W.; MILLER, J. M. Classification, identification, and clinical significance of *Proteus*, *Providencia*, and *Morganella*. **Clin Microbiol Rev.**, v. 13, n. 4, p. 534-46, 2000.

PACZOSA, M.K.; MECSAS, J. *Klebsiella pneumoniae*: Going on the Offense with a Strong Defense. **Microbiol Mol Biol Rev.**, v. 80, n. 3, p. 629-61, 2016.

PAR& A. (1564) Dix Livres de la Chirurgie. Trans. Thomas Johnson, London, 1649.

PEREIRA, S. G.; ROSA, A.C.; CARDOSO, O. Virulence factors as predictive tools for drug resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. **Virulence**, v. 6 , n. 7, p. 679-83, 2015.

RABIN N. et al., Biofilm formation mechanisms and targets for developing antibiofilm agents. **Future Med Chem**. v. 7, n. 4, p. 493-512, 2015.

RILEY, D. K; CLASSEN, D. C; STEVENS, L. E; BURKE, J. P. A large randomized clinical trial of a silver-impregnated urinary catheter: lack of efficacy and *staphylococcal* superinfection. **Am J Med**, v. 98, n. 4, p.349-356, 1995.

ROJAS-LOPEZ, M. et al. Intestinal Pathogenic *Escherichia coli*: Insights for Vaccine Development. **Front Microbiol.**, v. 9, p. 440, 2018.

RONALD, A. The etiology of urinary tract infection: traditional and emerging pathogens. **Am J Med.**, v. 113, 2002.

Ruutu M., Alfthan O., Talja M., Andersson LC Cytotoxicity of latex urinary catheters. **Br J Urol**, v.57, p.82-87, 1985.

SCHAFFER, J. N.; PEARSON, M. M. *Proteus mirabilis* and Urinary Tract Infections. **Microbiol Spectr.**, v. 3, n. 5, 2015.

SIDRIM, J. J. C. et al. Promethazine improves antibiotic efficacy and disrupts biofilms of *Burkholderia pseudomallei*. **Biofoul** (New York. Print)., v. 33, p. 88-97, 2017.

SIDRIM, J. J. C. et al. Chlorpromazine-impregnated catheters as a potential strategy to control biofilm-associated urinary tract infections. **Future Microbiol.**, v. 14, n. 12, p. 1023-1024, 2019.

SPENCER, J. D. et al., The innate immune response during urinary tract infection and pyelonephritis. **Pediatr Nephrol.**, v. 29, n. 7, p. 1139-49, 2014.

STEPANOVIC, S. et al. Biofilm formation by *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes* on plastic surface. **Lett Appl Microbiol**, v. 38, p. 428-32, 2004.

STEPANOVIĆ, 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, p. 891-99, 2007.

THOMAS, M. et al. Diagnosis, Prevention, and Treatment of Catheter-Associated Urinary Tract Infection in Adults: 2009 International Clinical Practice Guidelines from the Infectious Diseases Society of America. **Clinical Infectious Diseases**, v.50, n. 5, p. 625-663, 2010

WEINER-LASTINGER, L. M. *et al.* Antimicrobial-resistant pathogens associated with adult healthcare-associated infections: Summary of data reported to the National Healthcare Safety Network, 2015-2017. **Infect Control Hosp Epidemiol**, v. 41, n. 1, p. 1-18, 2020.

WENNER, J.J.; RETTGER, L. F. A Systematic Study of the *Proteus* Group of Bacteria J. **Bacteriol.** , v. 4, n. 4, p.: 331-53, 1919.

WYRES, K. L.; HOLT, K. E. *Klebsiella Pneumoniae* as a Key Trafficker of Drug Resistance Genes From Environmental to Clinically Important Bacteria. **Curr Opin Microbiol.**, v. 45, p.131-39, 2018.

ZAHEDANI, S. S.; TAHMASEBI, H.; JAHANTIGH, M. Coexistence of Virulence Factors and Efflux Pump Genes in Clinical Isolates of *Pseudomonas aeruginosa*: Analysis of Biofilm-Forming Strains from Iran. **Int J Microbiol**, v. 21, 2021.

ZHANG, L.; MAH, T. F. Involvement of a novel efflux system in biofilm-specific resistance to antibiotics. **J. Bacteriol.**, v. 190, n. 13, p. 4447–52, 2008