



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

BRUNO ROCHA AMANDO

**IMPREGNAÇÃO DE CATETERES URINÁRIOS COM MODULADORES DE
QUORUM SENSING E INIBIDOR DE BOMBAS DE EFLUXO PARA INIBIÇÃO DE
BIOFILMES BACTERIANOS ASSOCIADOS A INFECÇÃO DO TRATO URINÁRIO**

FORTALEZA-CE

2018

BRUNO ROCHA AMANDO

**IMPREGNAÇÃO DE CATETERES URINÁRIOS COM MODULADORES DE
QUORUM SENSING E INIBIDOR DE BOMBAS DE EFLUXO PARA INIBIÇÃO DE
BIOFILMES BACTERIANOS ASSOCIADOS A 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

2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária

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

- A498i Amando, Bruno Rocha.
Impregnação de cateteres urinários com moduladores de quorum sensing e inibidor de bombas de efluxo para inibição de biofilmes bacterianos associados a infecção do trato urinário / Bruno Rocha Amando. – 2018.
88 f. : il. color.
- Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Programa de Pós- Graduação em Microbiologia Médica, Fortaleza, 2018.
Orientação: Profa. Dra. Débora Castelo Branco de Souza Collares Maia.
1. Biofilmes. 2. Enterobacteriaceae. 3. Curcumina. 4. Furaneol. 5. Clorpromazina. I. Título.
CDD 616.9
-

BRUNO ROCHA AMANDO

Impregnação de cateteres urinários com moduladores de *quorum sensing* e inibidor de bombas de efluxo para inibição de biofilmes bacterianos associados a 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: 17/12/2018.

BANCA EXAMINADORA

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

Prof^ª. Dr^ª. Mirna Marques Bezerra Brayner
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Marcos Fábio Gadelha Rocha
Universidade Estadual do Ceará (UECE)

Prof. Dr. Nilberto Robson Falcão do Nascimento
Universidade Estadual do Ceará (UECE)

À Deus.

Aos meus pais, Socorro e Amauri.

À minha irmã Marília.

A todos meus amigos e colegas.

AGRADECIMENTO

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

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

À Prof^a. Dr^a. Débora Castelo Branco, por ter me recebido de braços abertos e por ter me dado a oportunidade de fazer parte desse mundo da microbiologia ao seu lado. Por me orientar de forma tão humana e humilde. Por ser esse exemplo de mulher, guerreira, trabalhadora e honesta, sendo um exemplo para todos.

Aos professores participantes da banca de qualificação, Dra. Cibele Barreto Mano de Carvalho e Silviane Praciano Bandeira pelo tempo, pelas valiosas colaborações e sugestões.

Aos professores participantes da banca de defesa, Dra. Mirna Marques Bezerra Brayner, Dr. Marcos Fábio Gadelha Rocha e Dr. Nilberto Robson Falcão do Nascimento também pelo tempo, pelas valiosas colaborações e sugestões.

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

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

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

Ao meu grande amigo André Costa, por estar sempre ao meu lado, por me apoiar em todas as minhas escolhas e por ser sempre aquele em que me espelho.

Aos meus amigos de laboratório, Crister, Carol, Anísio e, em especial, Cecília, por toda a ajuda, parceria, amizade e companheirismo ao longo desses dois anos.

Aos alunos de iniciação científica do laboratório, Rodrigo, Aline e, em especial, o Francisco Ivanilson, que me acompanhou em todos os experimentos, sendo um grande amigo e o meu braço direito e parceiro durante todo o mestrado.

À Marília Silveira, por sua amizade e parceria desde a faculdade, por me apresentar a pós-graduação de microbiologia médica da UFC e por toda sua ajuda e companheirismo ao longo da minha jornada acadêmica.

A todos os meus colegas do PPGMM.

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

Aos meus *roommates* e amigos, Odilon e Gleilton, pela amizade, por todo companheirismo e confiança depositada em mim.

Aos meus amigos de faculdade, Daniele, Maurício, Lucas e Sidsayde pela parceria durante nossa jornada na graduação.

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

A todos os meus professores da faculdade, em especial ao Jannisson Ribeiro e Rui Callou, por terem ajudado a me preparar para o mundo profissional e por serem grandes exemplos de profissionais.

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

A secretária Carol por toda paciência, ajuda e companheirismo ao longo do mestrado.

“Dans les champs de l'observation le hasard ne favorise que les esprits préparés.”

Louis Pasteur

RESUMO

A infecção do trato urinário representa 40% das infecções relacionadas à assistência à saúde, sendo o uso de dispositivos médicos um importante fator de risco para a sua ocorrência. A impregnação de cateteres urinários com antimicrobianos apresenta bons resultados, mas pode promover a pressão seletiva nos micro-organismos. Com isso, o uso de moduladores de *quorum sensing* e de inibidores de bomba de efluxo pode ser uma estratégia eficaz para combater a formação de biofilmes em cateteres, sem causar pressão seletiva. O objetivo desse trabalho foi avaliar a ação *in vitro* dos moduladores de *quorum sensing* curcumina (CUR) e furaneol (FUR) e do inibidor de bomba de efluxo clorpromazina (CPZ), impregnados em cateteres vesicais de demora, sobre a formação de biofilmes por bactérias associadas à infecção do trato urinário. Foram utilizados 18 isolados (6 *Escherichia coli*, 6 *Klebsiella pneumoniae* e 6 *Proteus mirabilis*), que foram avaliados quanto à sensibilidade, na forma planctônica, aos compostos, pela técnica de microdiluição em caldo. Em seguida, os compostos foram testados em diferentes concentrações sobre a formação de biofilmes e sobre biofilmes maduros. Posteriormente, os cateteres foram impregnados com soluções contendo CUR (1024 µM), FUR (10000 µM) ou CPZ (400 µg/mL) e o efeito da impregnação foi avaliado por microscopia eletrônica de varredura (MEV). A avaliação da formação de biofilmes nesses cateteres foi realizada por meio da contagem de ufc e os biofilmes foram avaliados por microscopia confocal. Por fim, o efeito da ciprofloxacina e do meropenem, foi avaliado em ensaios com cateteres impregnados, ou não, com CPZ. A CUR e FUR não apresentaram atividade inibitória sobre os uropatógenos, porém, a CPZ apresentou CIMs variando de 39,06 a 625 µg/mL. A CUR e a CPZ inibiram ($P < 0,05$) a formação de biofilmes *in vitro*. O sistema de energia dispersiva associado a microscopia eletrônica de varredura, demonstrou a efetiva impregnação dos cateteres com CUR, FUR e CPZ. Entretanto, somente os cateteres impregnados com CPZ inibiram ($P < 0,05$) a formação de biofilmes por todas as espécies. A microscopia confocal demonstrou biofilmes robustos em cateteres não impregnados e uma redução ou ausência, em alguns casos, de biofilmes em cateteres impregnados com CPZ. Finalmente, a ciprofloxacina e o meropenem potencializaram a inibição da formação de biofilmes ($P < 0,05$) em cateteres impregnados com CPZ. Assim, conclui-se que a impregnação de cateteres com o inibidor de bombas de efluxo CPZ pode ser uma estratégia promissora para a prevenção de infecções urinárias associadas ao uso de dispositivos médicos.

Palavras-chave: Biofilmes; Enterobacteriaceae; Curcumina; Furaneol; Clorpromazina.

ABSTRACT

Urinary tract infection accounts for 40% of healthcare-related infections and the use of medical devices is an important risk factor for its occurrence. The impregnation with antimicrobial urinary catheters presents good results, but promotes the selective pressure on microorganisms. Thus, the use of quorum sensing modulators and efflux pump inhibitors can be an effective strategy to combat biofilm formation in catheters without causing selective pressure. The objective of this study was to evaluate the in vitro effect of quorum modulators sensing curcumin (CUR) and furaneol (RUF) and the chlorpromazine efflux pump inhibitor (CPZ) impregnated in delay catheters on the formation of biofilms by bacteria associated to urinary tract infection. 18 isolates were used (6 *Escherichia coli*, 6 *Klebsiella pneumoniae* and 6 *Proteus mirabilis*), which were evaluated for sensitivity in the planktonic form, the compounds, by broth microdilution technique. Then the compounds were tested at different concentrations on biofilm formation and on mature biofilms. Subsequently, the catheters were impregnated with solutions containing CUR (1,024 μM), FUR (10,000 μM) or CPZ (400 $\mu\text{g/ml}$) and the impregnation was evaluated by scanning electron microscopy (SEM). The evaluation of the formation of biofilms in these catheters was performed by counting CFU and the biofilms were evaluated by confocal microscopy. Finally, the effect of ciprofloxacin and meropenem was evaluated in assays with catheters impregnated or not with CPZ. The CUR and FUR didn't present inhibitory activity on uropathogens, however, the CPZ had MICs ranging from 39.06 to 625 $\mu\text{g/mL}$. Cur and CPZ inhibited ($P < 0.05$) in vitro biofilm formation. The dispersive energy system associated with scanning electron microscopy demonstrated the effective impregnation of the catheters with CUR, FUR and CPZ. However, only the CPZ-impregnated catheters inhibited ($P < 0.05$) the formation of biofilms by all species. Confocal microscopy demonstrated robust biofilms on non-impregnated catheters and a reduction or absence, in some cases, of biofilms on CPZ-impregnated catheters. Finally, ciprofloxacin and meropenem potentiated the inhibition of biofilm formation ($P < 0.05$) in CPZ-impregnated catheters. Thus, it is concluded that catheter impregnation with the CPZ efflux pump inhibitor may be a promising strategy for the prevention of urinary infections associated with the use of medical devices.

Keywords: Biofilm; Enterobacteriaceae; Curcumin; Furaneol; chlorpromazine.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	– Patogênese das infecções do trato urinário	24
Figura 2	– Representação esquemática da formação do biofilme	31
Figura 3	– Fluxograma utilizado na metodologia do estudo	38
Figura 4	– Desenho esquemático para o teste de sensibilidade baseado no protocolo M100, CLSI (2017)	43
Figura 5	– Processo de diluição das amostras submetidas a agitação para desprendimento do biofilme	48
Figura 6	– Imagens obtidas por MEV dos fragmentos de cateter impregnados ou não com clorpromazina, curcumina e furaneol	64
Figura 7	– Imagens dos gráficos obtidos a partir da análise das imagens geradas pelo MEV dos fragmentos de cateter impregnados ou não com clorpromazina, curcumina e furaneol	65
Figura 8	– Imagens representativas dos fragmentos de cateter impregnados com curcumina e furaneol	66
Figura 9	– Imagens representativas dos fragmentos de cateter impregnados com furaneol e curcumina, respectivamente, cortados transversalmente	66
Figura 10	– Imagens representativas da contagem de unidades formadoras de colônias (ufc) por fragmentos de cateter impregnados com clorpromazina (400 µg/mL) ou não impregnados (controle)	70
Figura 11	– Biofilmes maduros de <i>Escherichia coli</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> e <i>Proteus mirabilis</i> crescidos em fragmentos de cateteres impregnados com clorpromazina (CPZ)	73

LISTA DE GRÁFICOS

- Gráfico 1** – Avaliação da formação de biofilmes por *Escherichia coli* (n=2), *Klebsiella pneumoniae* (n=2) e *Proteus mirabilis* (n=2) utilizando diferentes meios de cultura. Dados expressos como média e desvio padrão da absorbância da biomassa, mensurada pela coloração com cristal violeta 52
- Gráfico 2** – Avaliação da formação de biofilmes por *Escherichia coli* (n=6), *Klebsiella pneumoniae* (n=2) e *Proteus mirabilis* (n=2) em diferentes concentrações de inóculo, em caldo BHI acrescido de glicose 1%. Dados expressos como média e desvio padrão da absorbância da biomassa, mensurada pela coloração com cristal violeta 53
- Gráfico 3** – Curva de crescimento bacteriano dos isolados incluídos no estudo 53
- Gráfico 4** – Efeito do inibidor de bomba de efluxo clorpromazina (CPZ) sobre a formação de biofilmes por *Escherichia coli* (n=6), *Klebsiella pneumoniae* (n=6) e *Proteus mirabilis* (n=6). Dados expressos como média e desvio padrão da absorbância da biomassa, mensurada pela coloração com cristal violeta 55
- Gráfico 5** – Efeito do modulador de *quorum sensing* curcumina (CUR) sobre a formação de biofilmes de *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* e *Proteus mirabilis*. Dados expressos como média e desvio padrão da absorbância da biomassa, mensurada pela coloração com cristal violeta 56
- Gráfico 6** – Avaliação do modulador de *quorum sensing* furaneol (FUR) sobre a formação de biofilmes de *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* e *Proteus mirabilis*. Dados expressos como média e desvio padrão da absorbância da biomassa, mensurada pela coloração com cristal violeta 57
- Gráfico 7** – Efeito do inibidor de bomba de efluxo clorpromazina (CPZ) sobre 58

biofilmes maduros de <i>Escherichia coli</i> (n=6), <i>Klebsiella pneumoniae</i> (n=6) e <i>Proteus mirabilis</i> (n=6). Dados expressos como média e desvio padrão da absorvância da biomassa, mensurada pela coloração com cristal violeta	
Gráfico 8 – Efeito do modulador de <i>quorum sensing</i> curcumina (CUR) sobre biofilmes maduros de <i>Escherichia coli</i> (n=6), <i>Klebsiella pneumoniae</i> (n=6) e <i>Proteus mirabilis</i> (n=6). Dados expressos como média e desvio padrão da absorvância da biomassa, mensurada pela coloração com cristal violeta	59
Gráfico 9 – Efeito do modulador de <i>quorum sensing</i> furaneol (FUR) sobre biofilmes maduros de <i>Escherichia coli</i> (n=6), <i>Klebsiella pneumoniae</i> (n=6) e <i>Proteus mirabilis</i> (n=6). Dados expressos como média e desvio padrão da absorvância da biomassa, mensurada pela coloração com cristal violeta	60
Gráfico 10 – Concentrações inibitórias mínimas (CIMs) e concentrações eliminatórias mínimas sobre o biofilme (CEMBs) da clorpromazina contra isolados de <i>Escherichia coli</i> (n=6), <i>Klebsiella pneumoniae</i> (n=6) e <i>Proteus mirabilis</i> (n=6)	62
Gráfico 11 – Efeito da impregnação de cateteres demora com curcumina e furaneol sobre a formação de biofilmes por <i>E. coli</i> , <i>K. pneumoniae</i> e <i>P. mirabilis</i> . Dados expressos como média e desvio padrão da contagem de ufc/s por cateter de todos isolados	67
Gráfico 12 – Efeito da impregnação de cateteres de demora com clorpromazina sobre a formação de biofilmes por <i>Escherichia coli</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> e <i>Proteus mirabilis</i> , isoladamente. Dados expressos como média e desvio padrão da contagem de ufc/s por cateter	68
Gráfico 13 – Efeito da impregnação de cateteres de demora com clorpromazina sobre a formação de biofilmes por <i>Escherichia coli</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> e <i>Proteus mirabilis</i> . Dados expressos como média e desvio padrão da contagem de ufc/s por cateter em porcentagem	69

Gráfico 14 – Efeito de antimicrobianos meropenem (MER) e ciprofloxacina (CIP) sobre biofilmes maduros de *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* e *Proteus mirabilis* formados em fragmentos cateteres impregnados ou não com clorpromazina (CPZ). Dados expressos como média e desvio padrão da contagem de ufc's por cateter em porcentagem

71

Gráfico 15 – Análise da microscopia confocal de biofilmes maduros de *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* e *Proteus mirabilis* crescidos em cateteres impregnados com clorpromazina (CPZ). Controle de crescimento: fragmento de cateter não impregnado. Dados expressos como média e desvio padrão dos valores obtidos para os seguintes parâmetros: espessura máxima, biomassa, espessura média da biomassa, coeficiente de rugosidade (adimensional) e relação superfície: volume. *indica diferenças estatisticamente significativas entre cateteres impregnados com CPZ e controle não impregnado ($P < 0,05$)

72

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Isolados selecionados para o estudo	40
Tabela 2 – Sensibilidade de <i>Escherichia coli</i> (n=6), <i>Klebsiella pneumoniae</i> (n=6) e <i>Proteus mirabilis</i> (n=6) a clorpromazina (CPZ), curcumina (CUR), furaneol (FUR), ciprofloxacina (CIP) e meropenem (MER)	54
Tabela 3 – Sensibilidade dos biofilmes de <i>Escherichia coli</i> (n=6), <i>Klebsiella pneumoniae</i> (n=6) e <i>Proteus mirabilis</i> (n=6) a clorpromazina (CPZ), ciprofloxacina (CIP) e meropeném (MER)	61
Tabela 4 – Atividade citotóxica <i>in vitro</i> dos compostos. Valores de CI ₅₀ e o intervalo de confiança de 95% realizado pelo teste de rezasurina na linhagem de fibroblasto de pulmão de origem humana após 72 horas de exposição	63

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AHL	Acil-homosserinalactonas
AIEC	Adherent-invasive <i>Escherichia coli</i>
AIs	Moléculas autoindutoras
AIPs	Auto-inducing peptides
ATCC	American Type Culture Collection
BHI	Brain Heart Infusion
C	Celsius
CEMB	Concentração eliminatória mínima em biofilme
CIM	Concentração inibitória mínima
CIMB	Concentração inibitória mínima em biofilme
CIP	Ciprofloxacina
CLSI	Clinical Laboratory Standards Institute
CLSM	Confocal Laser Scanning Microscopy
CMRVS	Coleção de Microrganismos de Referência em Vigilância Sanitária
CPZ	Clorpromazina
CUR	Curcumina
DAEC	Diffusely adherent <i>Escherichia coli</i>
DMEN	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DP	Desvio padrão
DOc	Densidade óptica controle
DO ₄₉₀	Densidade óptica 490 nm
EAEC	<i>Echerichia coli</i> enteroagregativa
EDS	Energy Dispersive Spectroscopy
EHEC	Enterohemorrhagic <i>Echerichia coli</i>
EIEC	Enteroinvasive <i>Echerichia coli</i>
EPEC	Enteropathogenic <i>Echerichia coli</i>
ETEC	Enterotoxigenic <i>Echerichia coli</i>
ExPEC	<i>Echerichia coli</i> extraintestinais
Fla A	Flagelina A
Fla B	Flagelina B
FUR	Furaneol
GrAMM	Grupo Aplicado em Microbiologia Médica

INCQS	Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde
InPEC	<i>Escherichia coli</i> intestinais
IRAS	Infecções relacionadas à assistência a saúde
ITU	Infecção do trato urinário
ITUAC	Infecção do trato urinário associado a cateter
Kb	Kilobase
KPC	Carbapenemases de <i>Klebsiella pneumoniae</i>
MER	Meropenem
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
mg	Miligrama
MH	Mueller Hinton
mL	Mililitro
nm	Nanômetro
NMEC	Neonatal Meningitis <i>Escherichia coli</i>
PA	Pró análise
SAM	S-adenosilmetionina
ufc	Unidade formadora de colônia
UPEC	<i>Escherichia coli</i>
µg	Micrograma
µL	Microlitro
µM	Micromolar
µs	Microsegundo

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	21
2.1 Infecção do trato urinário (ITU)	23
2.1.2 Infecção do trato urinário associada a cateter (ITUAC)	24
2.1.3 Tratamento para ITUs	26
2.2 Enterobacteriaceae associada a infecção do trato urinário	26
2.2.1 Escherichia coli	26
2.2.2 Proteus mirabilis	28
2.2.3 Klebsiella pneumoniae	29
2.3 Biofilmes	30
2.3.1 Biofilmes associados a infecções de cateteres vesicais	32
2.4 Compostos moduladores de quorum sensing e inibidores de bomba de efluxo utilizados para inibição da formação de biofilmes	33
2.4.1 Clorpromazina	34
2.4.2 Curcumina	34
2.4.3 Furaneol	35
2.5 Impregnação ou revestimento de dispositivos biomédicos com antimicrobianos ou compostos antibiofilme	36
3 HIPÓTESES	37
4. OBJETIVO GERAL/ OBJETIVOS ESPECÍFICOS	37
4.1 Objetivo Geral	37
4.2 Objetivos específicos	37
5.1 Local do estudo	38
5.2 Micro-organismos do estudo	38
5.3 Determinação do protocolo de formação de biofilmes pelas bactérias selecionadas para a pesquisa	40
5.3.1 Meios de cultura	40
5.3.2 Concentração do inóculo	41
5.3.3 Curva de crescimento bacteriano	41
5.4 Determinação das concentrações inibitórias mínimas (CIM) do inibidor de bomba de efluxo clorpromazina, dos moduladores de quorum sensing e dos antimicrobianos contra isolados de E. coli, K. pneumoniae e P. mirabilis	41
5.4.1 Inóculos	42
5.4.2 Compostos e antimicrobianos	42

5.4.3 Preparo da placa e cultura	42
5.5 Análise do inibidor de bomba de efluxo clorpromazina e dos moduladores de <i>quorum sensing</i> curcumina e furaneol sobre a formação dos biofilmes por <i>E. coli</i> , <i>K. pneumoniae</i> e <i>P. mirabilis</i>	43
5.6 Avaliação da clorpromazina, curcumina e furaneol sobre biofilmes maduros de <i>E. coli</i> , <i>K. pneumoniae</i> e <i>P. mirabilis</i>	44
5.7 Determinação da concentração inibitória mínima em biofilme (CIMB) e eliminatória mínima em biofilme (CEMB) do inibidor de bomba de efluxo clorpromazina e dos antimicrobianos	45
5.8 Teste de toxicidade	45
5.9 Processo de impregnação dos fragmentos de cateter com clorpromazina, curcumina e furaneol	46
5.9.1 Avaliação por microscopia eletrônica de varredura dos fragmentos de cateter	46
5.10 Avaliação da ação do inibidor de bomba de efluxo clorpromazina e dos moduladores de <i>quorum sensing</i> curcumina e furaneol, impregnados em fragmentos de cateter, sobre a formação de biofilmes isolados de <i>E. coli</i> , <i>K. pneumoniae</i> e <i>P. mirabilis</i>	47
5.10.1 Montagem do experimento	47
5.10.2 Quantificação e leitura do teste biológico	47
5.11 Avaliação da ação de antimicrobianos sobre biofilmes maduros <i>E. coli</i> , <i>K. pneumoniae</i> e <i>P. mirabilis</i> formados em fragmentos cateteres impregnados ou não com clorpromazina	49
5.12 Avaliação por microscopia confocal dos biofilmes, formados em fragmentos de cateteres impregnados com clorpromazina, de <i>E. coli</i> , <i>K. pneumoniae</i> e <i>P. mirabilis</i>	49
5.13 Análise estatística.....	50
6.1 Avaliação da metodologia para induzir a formação de biofilmes em placas de microtitulação	51
6.2 Concentração inibitória mínima (CIM) do inibidor de bomba de efluxo clorpromazina, dos moduladores de <i>quorum sensing</i> e dos antimicrobianos contra os isolados de <i>Escherichia coli</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> e <i>Proteus mirabilis</i>	53
6.3 Efeito do inibidor de bomba de efluxo clorpromazina e dos moduladores de <i>quorum sensing</i> curcumina e furaneol sobre a formação de biofilmes por <i>E. coli</i> , <i>K. pneumoniae</i> e <i>P. mirabilis</i>	53

6.4 Avaliação do inibidor de bomba de efluxo clorpromazina e dos moduladores de <i>quorum sensing</i> curcumina e furaneol sobre biofilmes maduros de <i>E. coli</i> , <i>K. pneumoniae</i> e <i>P. mirabilis</i>	56
6.5 Concentração inibitória mínima em biofilme (CIMB) e eliminatória mínima (CEMB) do inibidor de bomba de efluxo clorpromazina, dos moduladores de <i>quorum sensing</i> e dos antimicrobianos aos isolados do estudo	60
6.6 Teste de toxicidade	62
6.7 Impregnação dos fragmentos de cateter com clorpromazina, curcumina e furaneol.....	63
6.8 Ação do inibidor de bomba de efluxo clorpromazina e dos moduladores de <i>quorum sensing</i> curcumina e furaneol, impregnados em fragmentos de cateter, na formação de biofilmes por <i>E. coli</i> , <i>K. pneumoniae</i> e <i>P. mirabilis</i>	66
6.9 Ação de antimicrobianos sobre biofilmes maduros de <i>E. coli</i> , <i>K. pneumoniae</i> e <i>P. mirabilis</i> formados em fragmentos de cateteres impregnados ou não com clorpromazina..	70
6.10 Análise da microscopia confocal dos biofilmes formados em fragmentos de cateteres impregnados com clorpromazina, combinados ou não com antimicrobianos, de <i>E. coli</i> , <i>K. pneumoniae</i> e <i>P. mirabilis</i>	71
7. DISCUSSÃO	73
8. CONCLUSÃO.....	78
REFERÊNCIAS	78

1. INTRODUÇÃO

A infecção do trato urinário (ITU) é definida como uma infecção que acomete qualquer parte do sistema urinário, como uretra, bexiga, ureteres e rins. Esse quadro infeccioso é mais na parte inferior do trato urinário, onde se encontram bexiga e uretra. Diversas causas e fatores favorecem a instalação da infecção, desde anormalidades anatômicas até o uso de dispositivos médicos.

A infecção do trato urinário associada a cateter (ITUAC) é a principal causa de infecções relacionadas à assistência à saúde (IRAS) no mundo, sendo responsável por cerca de 40% dessas infecções. Esse tipo de infecção é um problema de saúde pública mundial, pois eleva o tempo de internação do paciente no hospital, aumenta os custos com a hospitalização, além de elevar a taxa de mortalidade e morbidade. As ITUACs geralmente estão associadas a formação de biofilmes microbianos nos dispositivos médicos de permanência, como o cateter de Foley.

Biofilmes são comunidades microbianas de células sésseis que se formam em superfícies bióticas, como tecidos vivos, ou abióticas, como implantes e dispositivos médicos. Essas comunidades estão inseridas em uma matriz extracelular composta de água, exopolissacarídeos, ácidos nucleicos, proteínas, carboidratos e moléculas autoindutoras (AIs). Essas moléculas são responsáveis por toda coordenação demográfica, expressão de genes de virulência, nutrição e dispersão do biofilme, e compõem o sistema de *quorum sensing*.

Cerca de 80% das infecções, principalmente aquelas de natureza crônica, estão associadas a biofilmes microbianos, principalmente quando se trata de introdução e permanência de dispositivos médicos ou implantes. Essas infecções possuem uma menor resposta terapêutica devido à conformação do biofilme. A matriz extracelular promove uma maior proteção contra agentes externos, seja a defesa imunológica do hospedeiro ou a ação de agentes antimicrobianos.

Apesar da descoberta dos antibióticos ter sido revolucionária para o combate contra as infecções, o rápido surgimento de micro-organismos resistentes trouxe uma grande ameaça para a saúde pública, exigindo urgentes medidas para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas para tratar essas infecções e combater essas cepas resistentes. Desde então, muitas estratégias têm sido criadas para tratar tais infecções, incluindo, compostos naturais e compostos utilizados com outra finalidade na clínica, mas que possuem uma atividade antimicrobiana ou que agem sinergicamente com

antibióticos clássicos vem sendo estudados como possíveis adjuvantes terapêuticos. As modulações do *quorum sensing* também têm sido alvo de muitas pesquisas, pois a interferência nesse sistema impede que o biofilme se desenvolva ou pode desestruturá-lo, deixando essas estruturas microbianas mais vulneráveis à ação dos antibióticos usados na terapêutica. A inibição de bombas de efluxo, super expressas quando os micro-organismos estão em biofilmes, também é uma importante estratégia, já que, na literatura, muito já foi demonstrado sobre sua ação sinérgica com antimicrobianos.

Estudos *in vitro* utilizando cateteres revestidos ou impregnados com antibióticos clássicos mostraram-se bastante eficazes contra uropatógenos. Diretrizes internacionais sugerem que essas medidas podem ser uma eficiente estratégia para impedir ou retardar a ITAUCs, já que esses cateteres impregnados ou revestidos impedem a formação de biofilmes nos dispositivos médicos e aumentam a vida útil desses dispositivos. Por outro lado, a utilização de antimicrobianos pode forçar uma pressão seletiva nos micro-organismos e a consequente emergência de cepas resistentes.

Portanto, o uso de compostos capazes de agir em bombas de efluxo ou de modular o *quorum sensing* microbiano, impedindo a formação de biofilmes e deixando os micro-organismos mais vulneráveis à ação de antimicrobianos, pode ser uma efetiva estratégia para combater infecções. Nesse contexto, testamos a ação dos compostos moduladores de *quorum sensing* curcumina e furaneol e do inibidor de bomba de efluxo clorpromazina, impregnados em cateteres de demora, para controlar a formação de biofilmes por bactérias uropatogênicas.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Infecção do trato urinário

A infecção do trato urinário (ITU) é uma das mais comuns infecções bacterianas na comunidade e em ambiente hospitalar (ROSHNIAMALARADJOU *et al.*, 2013). É determinada quando há um quadro infeccioso acometendo os rins, ureteres, bexiga ou uretra. Sua incidência é maior em mulheres, por possuírem uma uretra mais curta, cuja abertura situa-se na vulva e próxima ao ânus, sítios anatômicos com grande quantidade de micro-organismos. Ademais, adultos com mais de 50 anos também são mais susceptíveis, devido a diversos fatores, como sistema imunológico debilitado, uso de medicamentos, prostatites, em homens, e infecções assintomáticas recorrentes (AL-BADR; AL-SHAIKH, 2013; JESUS; COELHO; LUZ, 2018).

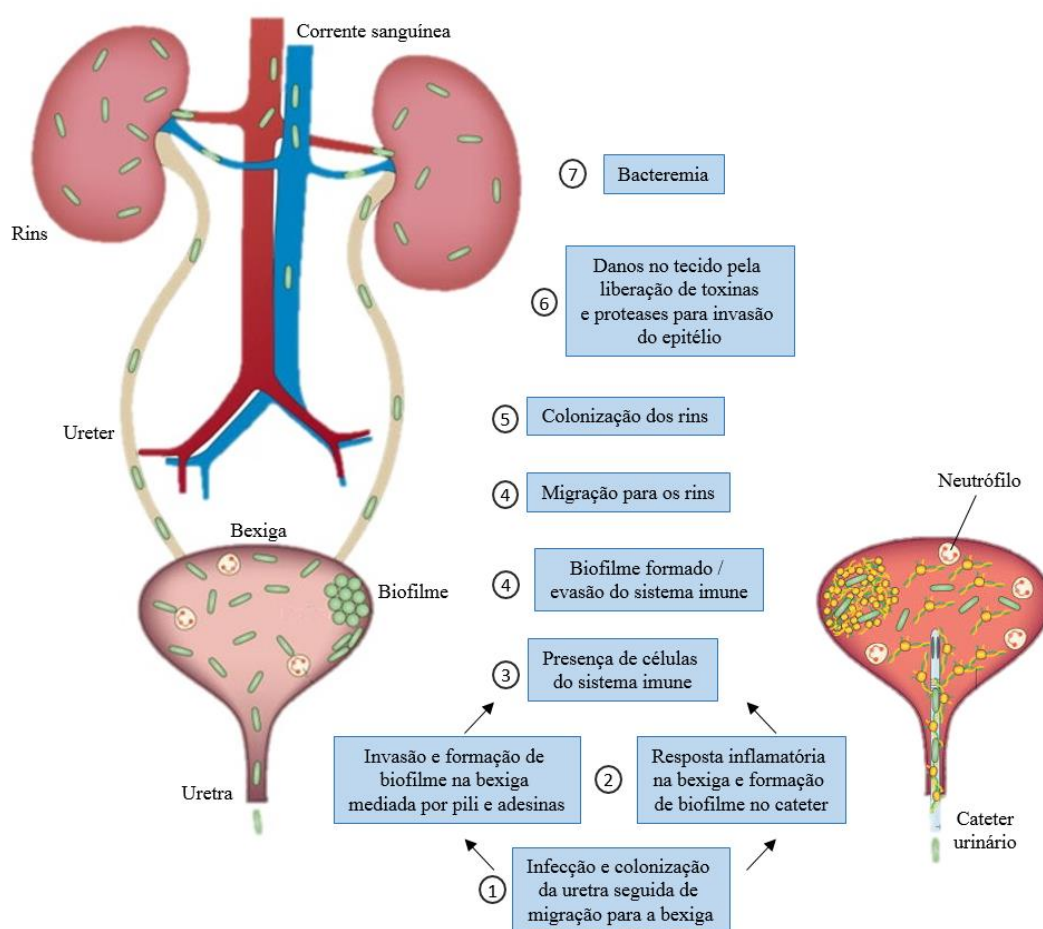
A ITU pode ser basicamente dividida em cistite, uretrite e pielonefrite, a depender da gravidade ou do grau de invasão microbiana. Assim, a pielonefrite ocorre quando há infecção renal, sendo, portanto, a forma mais grave, enquanto cistite e uretrite, as mais prevalentes, acometem somente o trato urinário inferior, a bexiga e a uretra, respectivamente. A infecção pode ocorrer por diversas causas, desde relações sexuais, anormalidades anatômicas e funcionais ou até mesmo pela introdução de dispositivos médicos (CHENOWETH, 2014; FOXMAN, 2010).

A patogênese se inicia pela infecção da região mais alta da uretra por algum patógeno, posteriormente, pela migração desses micro-organismos para as regiões mais ascendentes, como a bexiga, onde podem ou não colonizar, dependendo das interações patógeno-hospedeiro. Se instalada a infecção na bexiga, os uropatógenos podem continuar ascendendo, chegando aos rins, podendo também romper a barreira epitelial, invadindo a corrente sanguínea, causando bacteremia e podendo evoluir para um quadro de urosepsis. Todo esse processo é possível graças a fatores de virulência estruturais e não estruturais, como flagelos, pilis, toxinas e proteases que dão suporte na motilidade, invasão de epitélio e nutrição dos patógenos (FLORES-MIRELES *et al.*, 2015). A **figura 1** exemplifica de forma resumida esse processo.

A diferença entre a ITU e a infecção do trato urinário associado a cateter (ITUAC) é que a segunda dispensa as etapas iniciais, já que os micro-organismos são mecanicamente carregados para a parte mais proximal da uretra e para a bexiga, por meio da introdução do dispositivo no sistema urinário (FLORES-MIRELES *et al.*, 2015). Assim, as ITUs são uma das principais causas de infecções relacionadas à assistência à

saúde (IRAS) em pacientes internados em unidades hospitalares, representando de 30% a 60% dos casos (DUDECK *et al.*, 2013; HSIAO *et al.*, 2015; MASSON *et al.*, 2009). A maioria dos casos de ITUs em hospitais está associada a introdução e permanência de cateter urinário e o risco de infecção aumenta entre 3% e 10%, de forma cumulativa, a cada dia com a permanência do mesmo (CHENOWETH, 2011; HOOTON, 2010).

Figura 1 – Patogênese das infecções do trato urinário.



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

2.1.2 Infecção do trato urinário associada a cateter

O uso de dispositivos médicos é comum em ambiente hospitalar e o trato urinário é uma fonte frequente de IRAS, representando em torno de 40% dessas infecções (KLINE; LEWIS, 2016; RAJAKARUNA; HARBERM, 2014). Sabe-se que as IRAS têm uma característica multifatorial, por depender de diversos fatores, como as condições nutricionais do paciente, a imunidade reduzida, uso de antimicrobianos, a

presença de doenças de base, a introdução de dispositivos invasivos que rompem a barreira mecânica de proteção do indivíduo e o tempo de internação (SOUSA *et al.*, 2015; SOUSA *et al.*, 2017). Com isso, o uso de cateteres vesicais representa um importante fator de risco para a infecção do paciente (NICOLLE, 2014).

O cateter utilizado pode ser de silicone, látex ou ambos. O cateterismo é um procedimento que varia de acordo com a necessidade de cada paciente e com indicação médica, podendo ser de alívio, intermitente ou de demora. Além disso, esse procedimento deve ser realizado especificamente por enfermeiros, como preconiza a resolução nº 450/2013, publicada pelo Conselho Federal de Enfermagem (COFEN) (JESUS; COELHO; LUZ, 2018). As ITUACs estão comumente associadas à formação de biofilmes microbianos nos cateteres urinários de permanência, o que contribui para a elevação do tempo de internação do paciente, dos custos de hospitalização, da morbidade e da mortalidade (NEIDELL *et al.*, 2012; RAJAKARUNA; HARBERM, 2014).

A presença do biofilme pode mascarar a infecção, fazendo com que a presença de neutrófilo na urina não seja um bom indicador de infecção já que biofilmes tem como característica a evasão do sistema imune e que o tratamento seja menos eficaz, devido à maior resistência aos agentes antibacterianos, quando as bactérias estão crescidas na forma de biofilmes (KLINE; LEWIS, 2016; LEWIS, 2008). Esse tipo de infecção é um problema de saúde pública não só em países em desenvolvimento, mas também em países desenvolvidos e é causado por diversos patógenos, com destaque para as bactérias da família Enterobacteriaceae. Assim, *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis* e *Klebsiella pneumoniae* estão entre as bactérias Gram negativas mais frequentemente causadoras de ITUACs, mas cocos Gram positivos e fungos também podem causar essas infecções (FLORES-MIRELES *et al.*, 2015; FOXMAN, 2010; FOXMAN *et al.*, 2014; KLINE *et al.*, 2011; KLINE; LEWIS, 2016).

Só nos Estados Unidos, esse tipo de infecção apresenta mais de um milhão de casos por ano. No Brasil, a incidência é de até 7,4/1000 cateteres/dia, sendo que essa proporção aumenta de forma cumulativa, a cada dia, com a permanência do dispositivo (ANVISA, 2017; SINGHA *et al.*, 2017). A ITUAC representa cerca de 80% dos casos de IRAS em todo mundo, com *E. coli* como o micro-organismo mais frequentemente isolado, representando cerca de 80% a 90% dos casos (LO; LANGE; CHEW, 2014; TERLIZZI *et al.*, 2017).

2.1.3 Tratamento para ITUs

O tratamento para ITUs varia de acordo com a gravidade da infecção. Infecções que acometem partes mais baixas do sistema urinário, como cistites e uretrites, podem ser tratadas com antimicrobianos que possuem a capacidade de concentrar-se em grandes quantidades na urina, como a nitrofurantoína. Porém, para casos mais graves, como pielonefrites, o fármaco utilizado, além de ter a capacidade de atuar como bactericida para o uropatógeno em questão, ele também deve acumular, em altas concentrações no tecido renal. Sendo assim, as drogas mais utilizadas nesses casos são fluoroquinolonas, como a ciprofloxacina, e trimetoprim-sulfametoxazol, que possuem mais de 90% de eficácia em ensaios clínicos (JOHNSON; RUSSO, 2018).

Além disso, a antibioticoterapia empírica é realizada de acordo com uma estimativa, com base em dados epidemiológicos sobre resistência bacteriana e com dados do paciente sobre efeitos adversos, alergias, dentro outros (JOHNSON; RUSSO, 2018).

2.2 Enterobacteriaceae associada a infecção do trato urinário

A família Enterobacteriaceae é composta por uma gama de bactérias Gram negativas, anaeróbias facultativas, fermentadoras de glicose que não apresentam atividade de citocromo oxidase. Essas características permitem a diferenciação dessa família de outras bactérias Gram negativas fermentadoras ou não fermentadoras de glicose, com exceção de *Plesiomonas* spp. que, apesar de pertencerem a essa família, é o único gênero que possui atividade de oxidase positiva (JANDA *et al.*, 2016; KONEMAN *et al.*, 2012).

Além disso, são micro-organismos ubíquos, ou seja, estão presentes no solo, água, vegetação e fazem parte também da microbiota intestinal de animais e do homem. Apesar de fazerem parte da microbiota humana, eles são responsáveis por uma grande variedade de infecções, tanto na comunidade, quanto em ambientes hospitalares (BUSH, 2016). Os membros dessa família que mais causam ITUs e ITUACs são as espécies *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis* e *Klebsiella pneumoniae* (TANSARLI *et al.*, 2013).

2.2.1 *Escherichia coli*

Pertencente ao gênero *Escherichia*, a espécie *E. coli* é a mais predominante na microbiota intestinal dos homens e de animais. Foi relatada pela primeira vez por

Theodor Escherich, médico alemão que descreveu em detalhes o que chamou de *Bacterium coli commune* (bactéria comum do cólon), observadas nas fezes de crianças saudáveis (SHULMAN *et al.*, 2007). *E. coli* é um bacilo Gram negativo, móvel, que cresce em ambiente aeróbio ou em anaerobiose, de preferência a 37 °C, e fermenta a lactose. Essa última característica pode ser utilizada para diferenciar *E. coli* de espécies não fermentadoras de lactose, o que é observado em meios seletivos e diferenciais, como o ágar MacConkey, onde suas colônias apresentarão coloração avermelhada ou rosa, em decorrência da alteração do pH causada pela fermentação (CROXEN *et al.*, 2013).

Muito embora *E. coli* esteja, em sua grande maioria, como comensal ou em uma relação de mutualismo com os outros micro-organismos da microbiota gastrintestinal e com o hospedeiro, existem cepas que causam doenças no homem, como gastroenterites e ITUs, podendo também evoluir para graves doenças como síndrome hemolítica urêmica e meningite (BLOUNT, 2015; LIU, 2015). As cepas patogênicas de *E. coli* surgiram devido à aquisição de fatores de virulência geralmente codificados em profagos, plasmídeos, e ilhas de patogenicidade (FURNISS; CLEMENTS, 2018).

As cepas patogênicas de *E. coli* são divididas em dois grupos, as intestinais (InPEC) e as extraintestinais (ExPEC). As InPEC são responsáveis por doenças diarreicas e podem ser divididas em sete patótipos conhecidos, a *E. coli* enteropatogênica (EPEC), a enterohemorrágica (EHEC), a enteroagregativa (EAEC), a enteroinvasiva (EIEC), a enterotoxigênica (ETEC), a difusa aderente (DAEC) e, mais recentemente, e a aderente invasiva (AIEC). Por outro lado, as ExPEC causam, principalmente, meningites neonatais (NMEC) e infecções do trato urinário (UPEC) (ROJAS-LOPEZ *et al.*, 2018).

Apesar da divisão em grupos intestinais e extraintestinais, infecções em sítios extraintestinais também podem ter como agente um patotipo intestinal. A EAEC, por exemplo, mais associada a doenças diarreicas agudas, foi relatada em um surto de ITU, na Dinamarca (BOLL *et al.*, 2013). Outro patotipo que vem causando ITU é a EHEC, que geralmente não possui os fatores de virulência típicos de ExPEC, como fímbrias P e α -hemolisinas, mas vem apresentando um potencial uropatogênico elevado (TOVAL *et al.*, 2014). Assim, torna-se necessária a realização de mais estudos acerca desses patotipos.

2.2.2 *Proteus mirabilis*

Hauser, em 1885, utilizou, pela primeira vez, o nome *Proteus* para denominar uma bactéria com características pleomórficas, que era encontrada em carnes em decomposição (ARMBRUSTER; MOBLEY, 2012). *Proteus mirabilis* é um bacilo Gram negativo bem conhecido por sua capacidade de produzir uma enzima chamada urease, capaz de hidrolisar a uréia, produzindo dióxido de carbono e amônia, e por ser positivo para prova bioquímica da fenilalanina desaminase, enzima responsável por catalisar a remoção do grupo amina da fenilalanina, importante para nutrição e crescimento bacteriano (ARMBRUSTER *et al*, 2016; O'HARA; BRENNER; MILLER, 2000).

Outra característica importante para identificação da espécie é sua capacidade de *swarming* em meio de cultura, formando uma estrutura característica denominada de “véu do *Proteus*”. Isso é possível graças a grande quantidade de flagelos presentes na superfície da bactéria que são semelhantes aos de outras espécies bacterianas, mas que se diferenciam por dois fatores, o primeiro é que os genes que codificam os constituintes flagelares advém de um único locus de 54 kb presente no cromossomo (PMI1617-72) e o segundo é que a bactéria codifica duas flagelinas, a Fla A (PMI1620) e a Fla B (PMI1619), que englobam a estrutura de chicote do flagelo (SCHAFFER; PEARSON, 2015).

Graças a sua capacidade de hidrolisar a uréia, *P. mirabilis* altera o pH do ambiente tornando-o alcalino e fornece amônia, fonte de nitrogênio para nutrição também de outros micro-organismos, favorecendo infecções mistas (SCHAFFER *et al.*, 2016). Essa mudança de pH favorece a precipitação de íons de magnésio e cálcio formando cálculos urinários, mais precisamente a apatita, composta de fosfato de cálcio, e a estruvita, composta de fosfato de magnésio-amônio (NORSWORTHY; PEARSON, 2017). Dessa forma, a produção de urease e a subsequente predisposição para formação de cálculos urinários, representam um importante fator de virulência de *P. mirabilis*, considerando que esses cálculos podem bloquear o fluxo da urina e podem se juntar a outros micro-organismos, formando biofilmes cristalinos, principalmente quando há o uso de cateteres urinários, ocasionando infecções polimicrobianas (JONES *et al.*, 2005). Apesar de *P. mirabilis* causar entre 1% e 10% de todas as ITUs, quando associado ao uso de cateter urinário, essa prevalência sobe para cerca de 44%, estando associado a casos mais complicados da infecção, podendo evoluir para bacteremia e,

consequentemente, uma urosepse (JACOBSEN *et al.*, 2008; SCHAFFER; PEARSON, 2015).

2.2.3 *Klebsiella pneumoniae*

Inicialmente com o nome de bacilo de Friedländer, por ter sido descrita pelo médico patologista Carl Friedländer, em 1882, em pulmões de indivíduos que faleceram com pneumonia, *K. pneumoniae* só recebeu esse nome em 1886, em homenagem ao também patologista Edwin Klebs, que observou essas bactérias em 1875 (FRIEDLANDER, 1882; SHON; BAJWA; RUSSO, 2013). *K. pneumoniae* é um bacilo Gram negativo, fermentador de lactose e não móvel. Essas características somadas a outras são utilizadas para identificação laboratorial desse patógeno (BAGLEY, 1985). Ademais, é revestida por uma cápsula composta de polissacarídeos que funcionam como um fator de virulência, ajudando na evasão do sistema imune, ou seja, evitando a fagocitose (LEE *et al.*, 2017).

Antes relatada mais em pacientes imunocomprometidos ou hospitalizados, com pneumonia, infecção do trato urinário, bacteremia e meningite, *K. pneumoniae* passou a ter mais notoriedade como agente infeccioso devido ao surgimento de cepas hipervirulentas, capazes de causar doenças graves e fatais em indivíduos saudáveis e por seu perfil de resistência a múltiplas drogas (PACZOSA; MECSAS, 2016; LEE *et al.*, 2017), em decorrência de diversos mecanismos de resistência, como a produção de diversas classes de beta-lactamases. As carbapenemases de *Klebsiella pneumoniae* (KPCs), por exemplo, foram descobertas em 1996, nos Estados Unidos. Estas enzimas conseguem, de maneira eficaz, hidrolisar penicilinas, todas as cefalosporinas, monobactamas, carbapenêmicos e também os inibidores da β -lactamases (MUNOZ-PRICE *et al.*, 2013).

Outro fator de virulência de *K. pneumoniae* é sua hipermucoviscosidade, descrita pela primeira vez em meados da década de 80. É uma característica clínica com significativa relevância por estar diretamente associada a infecções graves em pacientes saudáveis, como o desenvolvimento de abscessos hepáticos (LEE *et al.*, 2017). Essa superprodução de exopolissacarídeo para formar a cápsula que envolve a bactéria é importante para o processo de formação e de maturação de biofilmes, por auxiliar na proteção dos micro-organismos contra estresses externos, como o sistema imune do hospedeiro, atritos e tratamento com antimicrobianos, tornando a infecção mais difícil de tratar e mais resistente às terapias antimicrobianas (GONÇALVES *et al.*, 2014).

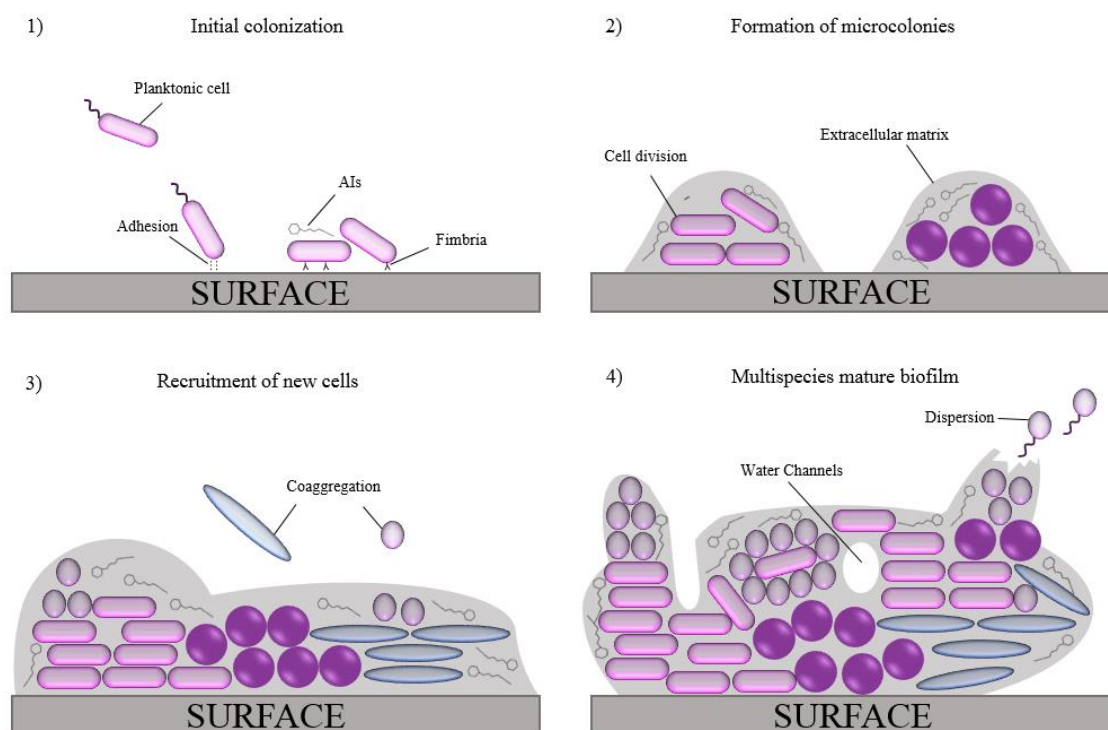
2.3 Biofilmes

De forma histórica, sempre se acreditou que os micro-organismos possuíam uma vida livre, unicelular. Apesar de Anton Van Leeuwenhoek, em 1683, ter descrito, o que chamou de “animalculos”, pela primeira vez, o que hoje denomina-se de biofilmes dentários, a teoria de biofilme só foi proposta em 1978, por Costerton *et al.* (1978) (FLEMMING; WINGENDER, 2010). Desde então, muitos pesquisadores propuseram várias definições, ao longo dos anos (COSTERTON; LAPPIN-SCOTT, 1995; DAVIES; GEESEY, 1995; MARSHALL, 1976).

Define-se biofilme como uma comunidade microbiana de células sésseis, aderidas a uma superfície que pode ser biótica, como tecidos vivos, ou abiótica, como implantes e dispositivos médicos, imersas em uma matriz extracelular polimérica produzida por elas próprias. Além de todas essas características estruturais dos biofilmes, as bactérias contam com um sistema de comunicação próprio, altamente complexo, chamado de *quorum sensing*, que coordena desde a densidade populacional à expressão de fatores de virulência (DONLAN; COSTERTON, 2002).

Existem vários modelos propostos para descrever as etapas de formação do biofilme, seja ele bacteriano ou fúngico, mono-espécie ou multi-espécies, porém, todos têm em comum as etapas básicas de formação: Adesão, fixação, formação de microcolônias, amadurecimento e dispersão de células para nova colonização, como demonstra a **figura 2** (ROILIDES *et al.*, 2015).

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



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

À medida que o biofilme vai se formando, as células microbianas podem se ligar a um substrato, como também podem se ligar a outras células. A matriz extracelular que envolve esses micro-organismos é constituída por biomoléculas altamente polares, como proteínas, lipídeos, polissacarídeos e ácidos nucleicos (OVERHAGE *et al.*, 2008). Essa matriz polimérica confere uma proteção à comunidade microbiana contra diversos estressores externos, como condições ambientais adversas, sistema imunológico do hospedeiro e drogas antimicrobianas (LI; LEE, 2017; ROY *et al.*, 2017).

Todo o processo de formação de biofilmes é coordenado por um sistema altamente complexo chamado *quorum sensing* (DELCARU *et al.*, 2016). O *quorum sensing* é um sistema de sinalização célula-célula que desencadeia mudanças no padrão de expressão gênica das células, ao passo que a densidade populacional aumenta. Esse sistema depende da produção de moléculas auto-indutoras (AIs) e da detecção de sinais extracelulares (ABISADO *et al.*, 2018; PAPENFORT; BASSLER, 2016). A produção das AIs se inicia ainda na forma planctônica dos micro-organismos, pois a produção é contínua e se acumula no local à medida que densidade populacional cresce (ABISADO *et al.*, 2018).

Existe uma diferença no sistema de *quorum sensing* entre as bactérias Gram positivas e Gram negativas. Enquanto as primeiras utilizam peptídeos, denominados peptídeos autoindutores (AIPs), as segundas utilizam pequenas moléculas denominadas de acil-homosserinalactonas (AHLs), ou outras moléculas cuja produção depende da S-adenosilmetionina (SAM) como substrato (ALI *et al.*, 2017; WEI *et al.*, 2011). A partir dessa comunicação, as populações microbianas regulam a expressão gênica, a formação de biofilmes, a densidade populacional, a produção de matriz extracelular e de fatores de virulência (RUTHERFORD; BASSLER, 2012).

Atualmente, a modulação de *quorum sensing* é uma importante estratégia para combater a expressão de fatores de virulência microbianos, dentre eles, a formação de biofilmes (WAHMAN *et al.*, 2015). Diversos estudos demonstram que a interferência nesse sistema impede a formação de biofilmes e torna os micro-organismos mais sensíveis aos antimicrobianos (SINGH *et al.*, 2017). Dessa forma, a modulação do sistema de *quorum sensing* pode ser uma estratégia eficaz para combater infecções causadas por micro-organismos resistentes, principalmente, quando associadas ao crescimento de biofilmes, pois compostos moduladores de *quorum sensing* não causam pressão seletiva, reduzindo, assim, a emergência de micro-organismos resistentes (MAURA *et al.*, 2016; STARKEY *et al.*, 2014).

2.3.1 Biofilmes associados a infecções de cateteres vesicais

Os biofilmes são responsáveis por cerca de 80% das infecções no homem, principalmente quando se trata de introdução e permanência de dispositivos médicos e implantes (BANDARA *et al.*, 2016; BLANCO *et al.*, 2018; TRENTIN *et al.*, 2013). Nos Estados Unidos, são introduzidos em pacientes mais de cinco milhões de cateteres venosos centrais anualmente, sendo que 50% dos pacientes acabam adquirindo alguma

infecção, em decorrência da formação de biofilmes (GULATI; NOBILE, 2016). No Brasil, além da ITU ser responsável por até 45% de todas as infecções adquiridas no ambiente hospitalar, 80% dessas infecções estão associadas ao uso de cateteres vesicais de demora (JESUS; COELHO; LUZ, 2018).

Essas infecções são mais difíceis de tratar, uma vez que as células microbianas, quando organizadas em biofilmes, se apresentam até mil vezes mais resistentes aos antimicrobianos, quando comparadas ao crescimento planctônico, contribuindo para o aumento do tempo de internação dos pacientes e para a consequente elevação dos custos com a saúde, os quais chegam, por exemplo, a cerca de 6,5 bilhões excedentes por ano só nos Estados Unidos. (NOBILE; JOHNSON, 2015; KART *et al.*, 2016; PEREIRA *et al.*, 2014; RAJENDRAN *et al.*, 2016).

2.4 Compostos moduladores de quorum sensing e inibidores de bomba de efluxo utilizados para inibição da formação de biofilmes

Apesar dos antibióticos serem extremamente importantes para o tratamento de muitas infecções, com o passar dos anos, a resistência a essas drogas vem aumentando, exigindo o desenvolvimento de novos antimicrobianos ou de novas estratégias terapêuticas para infecções (DASTIDAR *et al.*, 2013).

Muitas alternativas têm sido estudadas para tratar tais infecções. Compostos naturais, biomoléculas ou o redirecionamento de compostos utilizados clinicamente para outras finalidades, mas que possuem efeito antimicrobiano ou tem a capacidade de modular o biofilme, agindo no *quorum sensing* ou inibindo bombas de efluxo, por exemplo, tem sido testados isoladamente ou combinados com antimicrobianos clássicos para tratar ou potencializar o efeito de antimicrobianos, como também evitar a formação de biofilmes (ALTERIIS *et al.*, 2018; CASTELO BRANCO *et al.*, 2016; JORGE, LOURENÇO, PEREIRA, 2012; SIDRIM *et al.*, 2017).

Há diversos mecanismos pelos quais os micro-organismos podem evadir de agentes tóxicos, como antimicrobianos, dentre os quais, o mais conhecido é a produção de enzimas capazes de inativar antibióticos. Entretanto, outros mecanismos de resistência são descritos, como a formação de biofilmes, a alteração de sítios de ligação, a diminuição da permeabilidade da membrana e a atividade de bombas de efluxo. As bombas de efluxo são fisiologicamente essenciais para as bactérias, pois são responsáveis por manter a homeostase, fazem efluxo de açúcares e metabolitos, são responsáveis pelo efluxo das moléculas AIs, responsáveis pelo *quorum sensing*, e

também são capazes de fazer a extrusão de múltiplos fármacos. A inibição dessas bombas de efluxo, além de promover uma quebra na sinalização do *quorum sensing*, também permite uma melhor ação antimicrobiana e desregula a homeostase celular (ANDERSEN *et al.*, 2015).

Dessa forma, compostos não antimicrobianos clássicos, como moduladores de *quorum sensing* ou inibidores de bomba de efluxo, tornam-se ferramentas de grande importância na busca por novos adjuvantes terapêuticos que podem atuar como antimicrobianos ou como adjuvantes terapêuticos, por tornar os micro-organismos mais sensíveis às drogas (LASARRE; FEDERLE, 2013).

2.4.1 Clorpromazina

A clorpromazina (C₁₇H₁₉ClN₂S) é um antipsicótico utilizado no tratamento da esquizofrenia. É classificado como um inibidor de bomba de efluxo e sua ação antimicrobiana já foi bastante relatada na literatura, assim como sua ação sinérgica com antimicrobianos (COELHO *et al.*, 2015; COUTINHO *et al.*, 2010; GUILIAN *et al.*, 2016).

Sua atividade antimicrobiana já é estudada há mais de 30 anos, tanto contra bactérias Gram positivas e negativas, como contra bacilos álcool-ácido resistentes, atuando diretamente no aumento da permeabilidade da membrana celular (DASTIDAR *et al.*, 2013). Em um estudo utilizando a cepa *E. coli* ATCC 25922, os pesquisadores demonstraram que clorpromazina a 60 µg/mL inibe totalmente o crescimento da cepa e que concentrações inferiores aumentam a permeabilidade da membrana plasmática da mesma, deixando-a mais alongada (AMARAL; LORIAN, 1991).

Sua ação sinérgica com alguns antimicrobianos pode se dar pela ação na membrana e também por agir em bombas de efluxo, um dos mecanismos que a bactéria possui para expulsar substâncias tóxicas para o meio extracelular (DASTIDAR *et al.*, 2013).

2.4.2 Curcumina

A curcumina (C₂₁H₂₀O₆) é um polifenol, tido como um nutracêutico, derivado do rizoma de açafrão (*Curcuma longa*), planta pertencente à família do gengibre (HEWLINGS; KALMAN, 2017). A curcumina vem sendo utilizada em países asiáticos como tempero, há milhares de anos, e começou a ganhar prestígio e notoriedade quando seus benefícios à saúde começaram a ser cientificamente comprovados. Além de possuir

atividade anti-inflamatória, antioxidante, hipoglicemiante, cicatrizante, antimutagênica e anticancerígena, a curcumina também apresenta atividade antimicrobiana comprovada, inibindo totalmente o crescimento *in vitro* de *Helicobacter pylori* (GUPTA; PATCHVA; AGGARWAL, 2013; MAHADY *et al.*, 2002).

Por sua capacidade de intervir no *quorum sensing*, tendo como alvo moléculas sinalizadoras, a curcumina pode atuar de diversas formas contra os micro-organismos, diminuindo a produção de fatores de virulência, como proteases e sideróforos, e também impedindo a formação de biofilmes, como demonstrado no estudo com *Aeromonas sobria* feito por um grupo de pesquisadores da China (DING *et al.*, 2017).

A curcumina tem se mostrado bastante eficaz na inibição de diversas espécies bacterianas e também contra protozoários, evidenciando uma boa ação antimicrobiana. Ademais, a curcumina também possui a capacidade de agir sinergicamente com antimicrobianos de diferentes classes, como a cloroquina, utilizada para tratar malária, demonstrando diminuir a resistência deste fármaco de cepas de *Plasmodium falciparum* resistentes a ele (REDDY *et al.*, 2005; TEOW *et al.*, 2016).

2.4.3 Furaneol

O furaneol (C₆H₈O₃) é um composto aromático não halogenado, extraído de frutas, e muito utilizado na indústria alimentícia. Adicionalmente, a sua atividade antimicrobiana, anti-carcinogênica e antioxidante já foi comprovada (CHOI *et al.*, 2014; SCHWAB, 2013).

Recentemente, devido à busca por novas alternativas terapêuticas, ele se tornou um forte candidato para combater infecções e controlar fatores de virulência regulados por moléculas auto-indutoras, como no caso das AHLs em *Pseudomonas aeruginosa*, responsáveis por sinalizar a produção de toxinas, lipases, proteases e a formação de biofilmes (CHOI *et al.*, 2014). Nesse estudo, foram testadas concentrações abaixo da concentração inibitória mínima (CIM), demonstrando uma eficiente inibição da expressão de fatores de virulência e da produção de biofilmes por *P. aeruginosa* (CHOI *et al.*, 2014).

Segundo CHOI *et al.*, (2014), diferentemente da furanona halogenada, que já possui relatos na literatura de resistência microbiana associada ao uso da mesma, o furaneol é um composto não halogenado e menos tóxico, logo, podendo não forçar uma pressão seletiva em micro-organismos ou forçar uma menor pressão, graças a sua baixa toxicidade.

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

Diretrizes internacionais sugerem a impregnação ou o revestimento de cateteres de demora com compostos biocidas ou antimicrobianos como uma eficaz estratégia para impedir ou retardar o desenvolvimento de ITUACs (TENKE *et al.*, 2008). Existem pesquisas nas quais esses cateteres foram revestidos ou impregnados com íons de prata e nitrofurazona, os quais não foram clinicamente eficazes, ou impregnados com antimicrobianos, íons de prata e/ou antissépticos, os quais demonstraram ótimos resultados laboratoriais (FISHER *et al.*, 2015; PICKARD *et al.*, 2012).

Estudos *in vitro* com cateteres revestidos com azitromicina e fluoroquinolonas, como a ciprofloxacina mostraram-se bastante eficazes contra uropatógenos, tendo uma liberação da droga de forma lenta e contínua (SAINI; CHHIBBER; HARJAI, 2016). A combinação de rifampicina, esparfloxacina e triclosan impregnados em cateter de Foley podem prevenir em até 92% da formação de biofilmes, sendo ótimos bactericidas tanto para bactérias Gram positivas, quanto Gram negativas, inibindo o crescimento de cepas resistentes, mantendo sua atividade por um período longo, sem causar toxicidade ao tecido (FISHER *et al.*, 2015; LIM *et al.*, 2015).

Apesar de eficaz, a impregnação de cateteres com antimicrobianos clássicos, pode forçar uma pressão seletiva nos micro-organismos, promovendo a emergência de cepas resistentes. O uso de compostos capazes de agir no *quorum sensing* ou em bombas de efluxo impedindo a formação de biofilmes e/ou deixando os micro-organismos mais vulneráveis à ação de antimicrobianos pode ser uma efetiva estratégia para combater infecções, sem forçar o desenvolvimento de resistência.

Nesse contexto, propomos a impregnação de dispositivos médicos com compostos moduladores de *quorum sensing* (curcumina e furaneol) e com inibidor de bomba de efluxo (clorpromazina) para inibição da formação de biofilmes de *E. coli*, *K. pneumoniae* e *P. mirabilis*. Esses compostos não estão associados ao aumento da resistência bacteriana e podem atuar como um possível adjuvante terapêutico. Assim, espera-se, com esse trabalho, agregar conhecimento acerca da utilização de cateteres impregnados com os moduladores de *quorum sensing* curcumina e furaneol e o inibidor de bomba de efluxo clorpromazina para inibição da formação de biofilmes por espécies de *E. coli*, *K. pneumoniae* e *P. mirabilis*.

3 HIPÓTESES

1. Os moduladores de *quorum sensing* curcumina e furaneol e o inibidor de bombas de efluxo clorpromazina inibem a formação de biofilmes e biofilmes maduros de bactérias associadas à infecção do trato urinário.
2. A impregnação de cateteres urinários de demora com curcumina, furaneol e clorpromazina impede a formação de biofilmes bacterianos nesses dispositivos médicos.
3. A ação da ciprofloxacina e o meropenem é potencializada em biofilmes maduros, formados em cateteres impregnados.

4. OBJETIVO GERAL/ OBJETIVOS ESPECÍFICOS

4.1 Objetivo Geral

Avaliar o efeito *in vitro* dos moduladores de *quorum sensing* curcumina e furaneol e do inibidor de bombas de efluxo clorpromazina sobre a formação de biofilmes por bacilos Gram negativos associados a quadros de infecção do trato urinário.

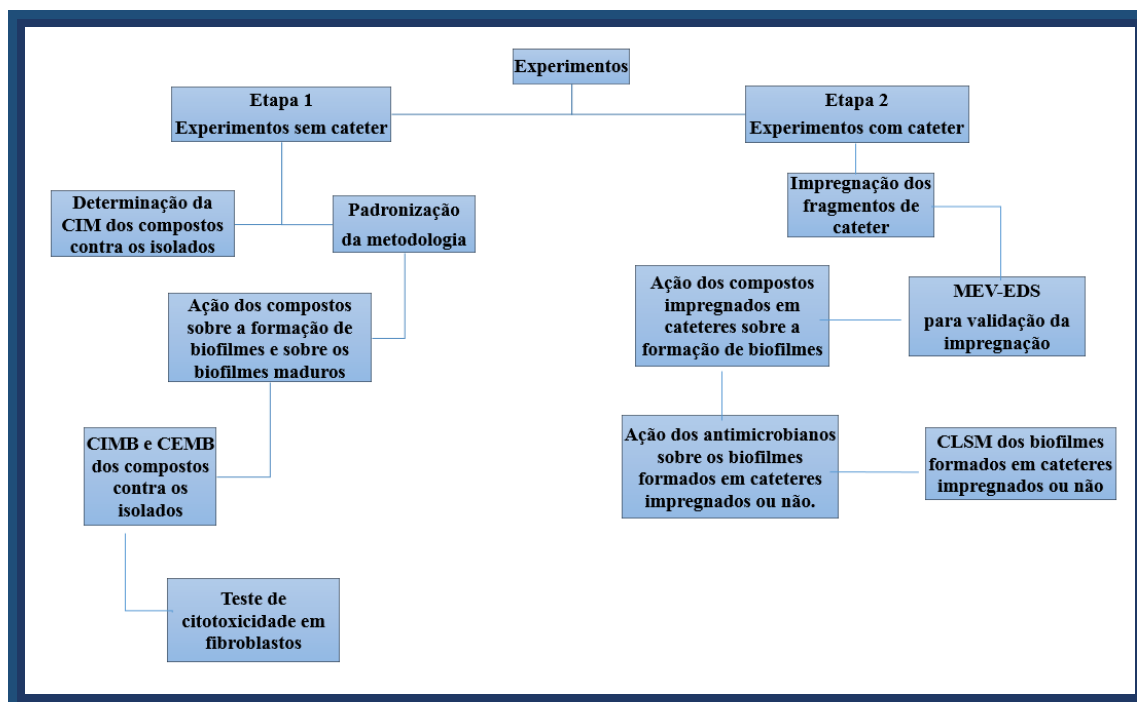
4.2 Objetivos específicos

1. Padronizar a metodologia de formação de biofilmes *in vitro* por *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis* e *Klebsiella pneumoniae* associadas à infecção do trato urinário inferior;
2. Determinar a sensibilidade *in vitro* de bacilos Gram negativos associados à infecção do trato urinário inferior, na forma planctônica, aos moduladores de *quorum sensing* curcumina e furaneol e ao inibidor de bombas de efluxo clorpromazina;
3. Avaliar o efeito *in vitro* da curcumina, do furaneol e da clorpromazina sobre a formação de biofilmes e sobre o biofilme maduro de cepas de *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis* e *Klebsiella pneumoniae*;
4. Avaliar o efeito da impregnação de cateteres urinários com curcumina, furaneol e clorpromazina sobre a formação de biofilmes por cepas de *E. coli*, *P. mirabilis* e *K. pneumoniae*;
5. Avaliar a eficácia da ciprofloxacina e do meropenem sobre biofilmes maduros formados em cateteres urinários impregnados ou não com clorpromazina.

5. METODOLOGIA

Um fluxograma com um resumo de como se deu o seguimento dos experimentos, para melhor compreensão da metodologia aplicada a pesquisa, pode ser observado através da **Figura 3**.

Figura 3 – Fluxograma utilizado na metodologia do estudo.



5.1 Local do estudo

A pesquisa foi realizada no laboratório de bacteriologia - Grupo Aplicado em Microbiologia Médica (GrAMM) e no Centro Especializado em Micologia Médica (CEMM) da Universidade Federal do Ceará, com colaboração da Central Analítica, para realização das imagens de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).

5.2 Micro-organismos do estudo

Foram selecionadas 15 isolados da bacterioteca do laboratório de bacteriologia do Grupo Aplicado em Microbiologia Médica (GrAMM), sendo 5 isolados da espécie *Escherichia coli*, 5 de *Klebsiella pneumoniae* e 5 de *Proteus mirabilis*. Todos os micro-organismos selecionados para a pesquisa foram isolados de urina e haviam sido

previamente identificados pelo VITEK[®] (bioMerieux), com exceção das cepas padrão utilizadas no estudo.

Além disso, mais 3 cepas padrão foram adicionadas a pesquisa, uma de cada espécie, todas doadas da Coleção de Microrganismos de Referência em Vigilância Sanitária-CMRVS, FIOCRUZ-INCQS, Rio de Janeiro, RJ com nomenclaturas: *Escherichia coli* INCQS 00033 (ATCC 25922), *Klebsiella pneumoniae* INCQS 00532 (ATCC 600703) e *Proteus mirabilis* INCQS 00265 (ATCC 29906). Os isolados ainda foram submetidos a uma bateria de provas bioquímicas para enterobactérias para garantir a pureza e a identificação das espécies.

Para inclusão no estudo, todos as cepas e os isolados foram avaliados quanto à produção de biofilmes. Para isso, foi adaptada a metodologia de quantificação de Stepanovic *et al.* (2004, 2007) para *E. coli*, *K. pneumoniae* e *P. mirabilis*. De forma resumida, cada poço de uma placa de microtitulação de 96 poços com fundo chato foi inoculado com 200 µL de uma suspensão padronizada ($1,7 \times 10^7$ ufc/mL), preparada com caldo infusão cérebro coração (BHI) enriquecido com 1% de glicose. Após a inoculação nos poços, as placas foram incubadas em estufa bacteriológica a 37 °C, por 48 horas, para formação do biofilme. Cada isolado foi inoculado em triplicata na placa e cada placa teve poços com controles de esterilidade.

Para a quantificação da biomassa dos biofilmes aderidos nas placas, utilizou-se a espectrofotometria para mensurar a densidade óptica a um comprimento de onda de 490 nm (DO_{490}) e o corante cristal violeta (BANDEIRA *et al.*, 2013). O ponto de corte (DO_c) para formador de biofilme foi calculado como a média da DO_{490} do controle de esterilidade acrescida de 3x o desvio padrão. Assim, as bactérias foram classificadas em quatro categorias: não formadoras de biofilme ($DO_{490} \leq DO_c$), fracas formadoras de biofilme ($DO_c < DO_{490} \leq 2 \times DO_c$), moderadas formadoras de biofilme ($2 \times DO_c < DO_{490} \leq 4 \times DO_c$) e fortes formadoras de biofilme ($DO_{490} > 4 \times DO_c$).

Tabela 1 – Isolados selecionados para o estudo.

Cepa	Código	Perfil de sensibilidade	Origem	Formação de biofilme
<i>Escherichia coli</i>	ECAT	Sensível	ATCC 25922	Fraco
<i>Escherichia coli</i>	ECS5	Resistente ¹	Urina	Moderado
<i>Escherichia coli</i>	ECS8	Sensível	Urina	Moderado
<i>Escherichia coli</i> enteroagregativa	EAEC	Sensível	Cepa padrão*	Forte
<i>Escherichia coli</i>	EC1R	Resistente	Urina	Moderado
<i>Escherichia coli</i>	EC2R	Resistente	Urina	Moderado
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	KLAT	Resistente	ATCC 600703	Forte
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	KL1S	Sensível	Urina	Moderado
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	KL2S	Resistente	Urina	Moderado
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	KL1B	Resistente	Urina	Moderado
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	KL2B	Resistente	Urina	Moderado
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	KL2M	Resistente	Urina	Forte
<i>Proteus mirabilis</i>	PRAT	Sensível	ATCC 29906	Forte
<i>Proteus mirabilis</i>	PRS1	Sensível	Urina	Moderado
<i>Proteus mirabilis</i>	PRS4	Sensível	Urina	Moderado
<i>Proteus mirabilis</i>	PRS6	Sensível	Urina	Moderado
<i>Proteus mirabilis</i>	PRMR1	Resistente	Urina	Forte
<i>Proteus mirabilis</i>	PRMR2	Resistente	Urina	Forte

¹ Resistência a pelo menos uma classe antimicrobiana.

* Cepa de referência *Escherichia coli* enteroagregativa.

5.3 Determinação do protocolo de formação de biofilmes pelas bactérias selecionadas para a pesquisa

Com intuito de promover uma maior formação de biofilme pelas cepas incluídas no estudo, realizaram-se testes utilizando adaptações à metodologia de formação de biofilme descrita acima. Para isso, foi utilizado o mesmo protocolo, variando a concentração do inóculo bacteriano, os meios de cultura e o tempo de crescimento bacteriano, previamente à formação do biofilme.

5.3.1 Meios de cultura

Para a escolha do melhor meio de cultura para os isolados escolhidos do estudo, foram testados os meios Mueller Hinton (MH) sem adição glucose, Infusão cérebro coração (BHI), Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) e também o BHI enriquecido com 1% de glicose.

5.3.2 Concentração do inóculo

Com o intuito de promover uma melhor formação de biofilmes pelos isolados, o protocolo de formação de biofilme foi testado utilizando seis cepas de *E. coli*, duas cepas de *K. pneumoniae* e duas cepas de *P. mirabilis*, com diferentes concentrações de inóculos. As concentrações escolhidas para o teste foram as turvações de 0,5, 2, 4 e 6 na escala de McFarland.

5.3.3 Curva de crescimento bacteriano

Foi realizada a curva de crescimento bacteriano para os isolados selecionados. Para isso, foram previamente semeados por esgotamento em ágar BHI e incubados em estufa bacteriológica a 37° C, por 24 horas, para isolamento das unidades formadoras de colônias (ufc). Após esse procedimento, foram aliqüotados 4 mL de caldo BHI enriquecido com 1% de glicose em tubos de hemólise e uma colônia de cada placa semeada foi retirada com auxílio de alças bacteriológicas e inoculadas nos respectivos tubos. Posteriormente foram incubadas em estufa bacteriológica a 37° C para promover o crescimento bacteriano. A cada 2 horas, os tubos foram retirados e 200µL de cada tubo foram transferidos para uma placa de microtitulação de 96 poços. A leitura foi realizada por um espectrofotômetro leitor de microplacas por absorbância ELx800® (Biotek, EUA) em um comprimento de onda de 490 nm.

Os valores foram organizados de forma cronológica em uma planilha do Excel até o fim do experimento que durou um período de 32 horas. Um gráfico para avaliação da curva foi criado a partir da planilha.

5.4 Determinação das concentrações inibitórias mínimas (CIM) do inibidor de bomba de efluxo clorpromazina, dos moduladores de *quorum sensing* e dos antimicrobianos contra isolados de *E. coli*, *K. pneumoniae* e *P. mirabilis*

A sensibilidade dos 18 isolados ao inibidor de bomba de efluxo clorpromazina (5 mg/mL, HYPOFARMA), aos moduladores de *quorum sensing* curcumina (solúvel em etanol 95%; SYBIYA *et al.*, 2013) e furaneol (hidrossolúvel; HENTZER *et al.*, 2003), e aos antimicrobianos foi avaliada de acordo com o documento M100 - S27 do Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI, 2017). A cepa de *E. coli* ATCC 25922 e a droga antibacteriana clássica ciprofloxacina (CLSI, 2017), permitiram validar o experimento.

5.4.1 Inóculos

Inicialmente, os isolados foram semeados em ágar BHI e incubados em estufa bacteriológica a 37 °C, por 24 horas, para crescimento bacteriano. Após isso, os inóculos bacterianos foram preparadas em solução salina estéril, ajustando a turbidez a 0,5 na escala de McFarland, que corresponde a $1,5 \times 10^8$ ufc/mL. Em seguida, os inóculos foram diluídos em caldo MH, até alcançar a concentração recomendada de 5×10^5 ufc/mL.

5.4.2 Compostos e antimicrobianos

As concentrações testadas dos compostos foram de 0,5 - 512 μ M para curcumina, 9,76 - 5.000 μ M para o furaneol e 2,44 - 1.250 μ g/mL para clorpromazina. Já para os antimicrobianos selecionados para a pesquisa, as concentrações utilizadas foram 0,0005 - 16 μ g/mL para ciprofloxacina e de 0,03 - 16 μ g/mL para meropenem.

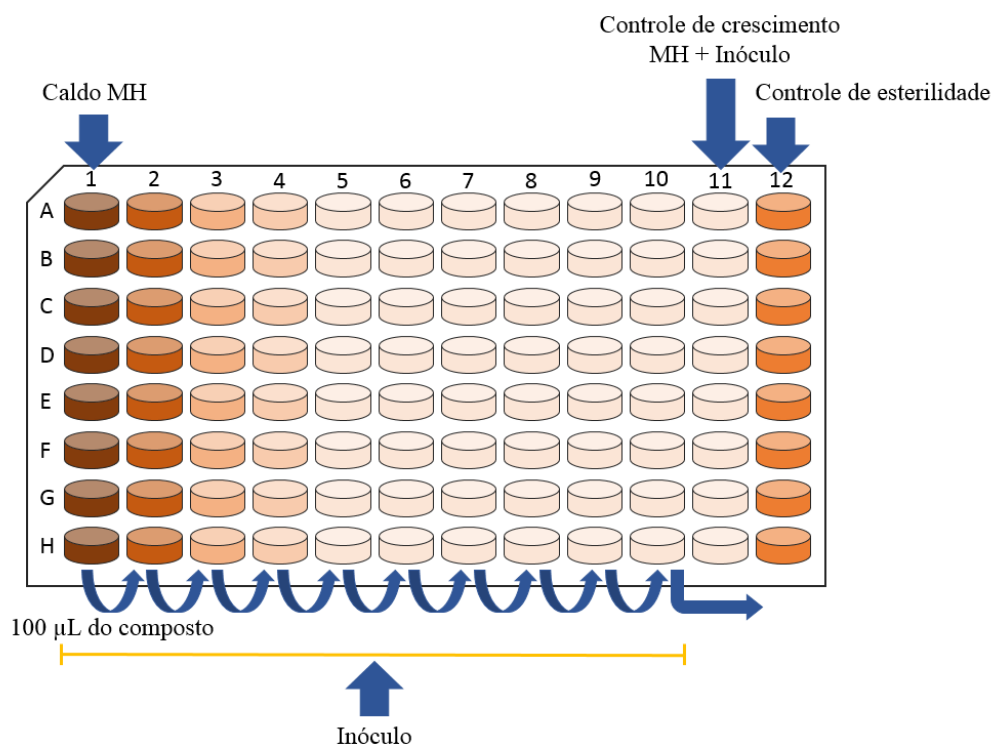
5.4.3 Preparo da placa e cultura

Foram utilizadas para o ensaio placas de microtitulação de 96 poços de fundo em U, nas quais foram adicionadas 100 μ L de caldo MH em cada poço. Em seguida, foram adicionados mais 100 μ L de cada composto somente na primeira coluna das respectivas placas. Cada placa foi utilizada para o ensaio de um composto isolado, após a adição dos compostos na primeira coluna, foi realizada a microdiluição, homogeneizando e retirando 100 μ L dos poços da coluna 1 e os adicionando nos poços da coluna 2, onde repetiu-se a homogeneização e retirada também de 100 μ L para adição nos poços da coluna 3 e, assim, sucessivamente, até a coluna 10. Posteriormente, foram retirados 100 μ L da coluna 10 e transferidos para a coluna 12, a qual foi utilizada como controle de esterilidade do experimento. Os poços da coluna 11 foram utilizados como controle de crescimento do ensaio, assim, não houve a adição de compostos nessa coluna, somente meio de cultura e inóculo bacteriano. Após a diluição dos compostos nas placas, 100 μ L do inóculo preparado anteriormente foi adicionado a cada poço, da coluna 1 a coluna 11. A **Figura 4** demonstra, de forma resumida, o esquema de preparo da placa. As placas foram incubadas em estufa bacteriológica a 37 °C, por 24 horas. A leitura da placa foi realizada de forma visual, como recomendam os protocolos do CLSI. Todo o ensaio foi realizado em duplicata.

Para a leitura dos testes de sensibilidade, buscou-se encontrar a menor concentração de curcumina e furaneol capaz de inibir 100% do crescimento microbiano,

em relação ao poço controle de crescimento livre de drogas. Por outro lado, a concentração inibitória mínima (CIM) para clorpromazina e para os antimicrobianos ciprofloxacina e meropenem foi definida como a menor concentração capaz de causar 100% de inibição do crescimento (SIDRIM *et al.*, 2017).

Figura 4 – Desenho esquemático para o teste de sensibilidade baseado no protocolo M100, CLSI (2017).



Fonte: Elaborado pelo autor.

5.5 Análise do inibidor de bomba de efluxo clorpromazina e dos moduladores de *quorum sensing* curcumina e furaneol sobre a formação dos biofilmes por *E. coli*, *K. pneumoniae* e *P. mirabilis*

Foi avaliado o efeito do inibidor de bomba de efluxo clorpromazina e dos moduladores de *quorum sensing* curcumina e furaneol sobre a formação de biofilmes dos isolados selecionados. O ensaio foi realizado em placas de microtitulação de 96 poços de fundo chato, de acordo com Bandeira *et al.* (2013). Inicialmente, os microorganismos foram semeados em ágar BHI e incubados à 37 °C, por 24 horas. Após isso, os inóculos foram preparados utilizando 1 mL de salina estéril por tubo de hemólise para cada bactéria. A turbidez foi ajustada de acordo com a escala 0,5 de McFarland, que corresponde a $1,5 \times 10^8$ ufc/mL. Foram utilizadas três concentrações de composto a partir do teste de sensibilidade realizado anteriormente. Para clopromazina, foram utilizadas as concentrações 10, 20 e 40 µg/mL contra os isolados de *E. coli* e *K.*

pneumoniae, já para os isolados de *P. mirabilis*, as concentrações de clorpromazina utilizadas foram de 156, 312,5 e 625 µg/mL. Como não foram encontrados valores de CIM para os compostos curcumina e furaneol, optou-se por se trabalhar com as maiores concentrações testadas, começando em 513, 51,3 e 25,6 µM para curcumina e 250, 500 e 5000 µM para furaneol.

As diluições para a avaliação do biofilme em formação foram preparadas em tubos Falcon estéreis e, posteriormente, distribuídas nas placas de forma ordenada, onde as colunas 1,2 e 3 receberam 175 µL de caldo BHI enriquecido com 1% de glicose por poço, as colunas 4, 5 e 6 receberam 175 µL de caldo BHI enriquecido com 1% de glicose mais a maior concentração do composto, as colunas 7, 8 e 9 receberam 175 µL de caldo BHI enriquecido com 1% de glicose mais a concentração intermediária e as colunas 10, 11 e 12 receberam 175 µL de caldo BHI enriquecido com 1% de glicose mais a menor concentração. Em todas as placas foram incluídos os controles de esterilidade. Após as placas estarem com as diluições distribuídas, 25 µL de cada inóculo foram adicionados para completar 200 µL de solução por poço. As placas foram incubadas a 37 °C, por 48 horas, para formação do biofilme e quantificadas por cristal violeta após o término da incubação, por espectrofotometria, conforme descrito na **seção 5.3**.

5.6 Avaliação da clorpromazina, curcumina e furaneol sobre biofilmes maduros de *E. coli*, *K. pneumoniae* e *P. mirabilis*

Para a avaliação do biofilme maduro, foram inoculados 200 µL de uma suspensão padronizada ($1,7 \times 10^7$ ufc/mL) preparada com 175 µL de caldo BHI enriquecido com 1% de glicose mais 25µL do inóculo por toda a placa, como já descrito anteriormente. As placas foram incubadas em estufa bacteriológica a 37 °C, por 48 horas para formação do biofilme. Após esse período, as placas foram lavadas cuidadosamente com PBS estéril, poço por poço, e foi adicionado caldo BHI enriquecido com 1% contendo as mesmas três diferentes concentrações dos compostos descritas na **seção 5.5**. As placas foram incubadas novamente a 37 °C, em estufa bacteriológica, por mais 24 horas, e, em seguida, submetidas à quantificação por cristal violeta e lidas com o auxílio do espectrofotômetro (DO₄₉₀).

5.7 Determinação da concentração inibitória mínima em biofilme (CIMB) e eliminatória mínima em biofilme (CEMB) do inibidor de bomba de efluxo clorpromazina e dos antimicrobianos

Para avaliar a sensibilidade do biofilme maduro dos isolados aos compostos, foi realizado o mesmo protocolo para formação de biofilme como já descrito acima na **seção 5.5**. Após as 48 horas necessárias para a formação dos biofilmes, todos os poços foram lavados cuidadosamente com NaCl e 100 µL de meio BHI enriquecido com 1% glicose foi adicionado a cada poço. O intervalo de concentração de cada composto foi determinado de acordo com a sensibilidade dos isolados na forma planctônica. Assim, 100 µL de cada composto foram adicionados à coluna 1, a partir da qual foi feita a diluição até a coluna 12. Em seguida, 100 µL de BHI enriquecido com glicose 1% foram adicionados a cada poço da placa. Assim, o intervalo de concentração final foi de 0,61 a 1.250 µg/mL para clorpromazina, de 0,0625 a 128 µg/mL para meropenem e de 0,3 a 625 µg/mL para ciprofloxacina.

As placas foram incubadas novamente em estufa bacteriológica por 24 horas e a avaliação foi realizada de forma visual, após esse período, acrescentando 20 µL do corante resazurina em cada poço, deixando reagir por 1 hora. Vale ressaltar que curcumina e furaneol não foram incluídos nessa etapa por não apresentarem atividade inibitória sobre os micro-organismos.

5.8 Teste de citotoxicidade

Foram utilizados fibroblastos de pulmão de origem humana, da linhagem MRC-5. As células foram cultivadas em garrafas para cultura de células em meio DMEM, enriquecido com 10% de soro bovino fetal (SBF) e 1% de antibióticos (penicilina/estreptomicina), mantidas em estufa com atmosfera de 5% de CO² a 37 °C. Após isso, foram semeadas em placas de 96 poços com 5 x 10³ células/poço (100 µL/poço) e mantida na estufa com atmosfera de 5% de CO² a 37 °C, por 24 horas para aderência. Diluições seriadas, em triplicata, foram realizadas obedecendo as concentrações de clorpromazina (32 – 2048 µg/mL), furaneol (78,125 – 5000 µM), curcumina (8 – 512 µM). O controle negativo foi tratado com DMSO e etanol. As células foram incubadas por 72 horas. Posteriormente, duas horas antes de finalizar o tratamento, foram adicionados 20 µL de resazurina nos poços e a placa foi reincubada por 3 horas. As placas foram lidas no espectrofotômetro de placa a um comprimento de onda de 465/540 nm.

A análise foi realizada através do percentual de inibição x log da concentração, determinadas suas CI_{50} e seus respectivos intervalos de confiança (IC 95%) a partir de regressão não-linear, utilizando o programa Prisma versão 5.0 (GraphPad Software).

5.9 Processo de impregnação dos fragmentos de cateter com clorpromazina, curcumina e furaneol

O processo de impregnação dos fragmentos de cateter foi realizado de acordo com protocolo modificado, baseado em Fisher *et al.* (2015). Inicialmente, os cateteres vesicais de demora de látex e revestidos com silicone (nr 12, SOLIDOR[®]) foram cortados, com auxílio de um bisturi, em fragmentos com aproximadamente 1 cm de comprimento e colocados em um béquer com clorofórmio P.A., por 1 hora, para dilatação do material. A parte utilizada do cateter foi a central, as extremidades foram descartadas desse procedimento.

Após uma hora no clorofórmio, os fragmentos foram retirados cuidadosamente, para evitar a destruição do material, e colocados em outros quatro recipientes, um contendo somente água destilada estéril, utilizado como controle de crescimento, outro contendo uma solução de clorpromazina (400 $\mu\text{g/mL}$), outro contendo uma solução de curcumina (1.024 μM) e o outro recipiente contendo uma solução de furaneol (10.000 μM). As três soluções foram preparadas utilizando água destilada estéril. Os fragmentos ficaram imersos na solução por mais 30 minutos, sendo agitados no Certomat[®] MO com rotação de 100 RPM por minuto para que os compostos penetrassem todo o material, impregnando todo o cateter e não só a superfície. Depois dos 30 minutos imersos em solução, cada fragmento foi retirado com auxílio de uma pinça, colocados em recipientes e levados para estufa de secagem por 12 horas.

Todo o processo foi realizado de forma asséptica. Para comprovar a esterilidade dos fragmentos, amostras foram retiradas, colocadas em tubos contendo caldo BHI e levadas para a estufa bacteriológica a 37 °C, por 24 horas. Nenhuma turvação foi observada, comprovando a esterilidade do material.

5.9.1 Avaliação por microscopia eletrônica de varredura dos fragmentos de cateter

Fragmentos impregnados e não impregnados foram submetidos a microscopia eletrônica de varredura (MEV) com sistema de energia dispersiva (EDS) para avaliação da superfície e impregnação dos materiais. As análises foram realizadas na Central Analítica da UFC. Após a impregnação do material, os fragmentos foram levados para a

Central Analítica, onde foram colocadas em *stubs* e, logo em seguida, foram metalizados e armazenados até o dia da análise no microscópio INSPECT S50. As imagens foram obtidas em quatro aumentos diferentes (5.000x, 2.500x, 1.000x e 100x) em uma velocidade de varredura de 30 μ s.

5.10 Avaliação da ação do inibidor de bomba de efluxo clorpromazina e dos moduladores de *quorum sensing* curcumina e furaneol, impregnados em fragmentos de cateter, sobre a formação de biofilmes isolados de *E. coli*, *K. pneumoniae* e *P. mirabilis*

Posteriormente à impregnação dos fragmentos com os compostos, foi realizado o teste biológico *in vitro* para avaliar a ação da clorpromazina, da curcumina e do furaneol sobre a formação de biofilmes por *E. coli* (ECAT e EAEC), *K. pneumoniae* (KLAT, KL2M e KL1S) e *P. mirabilis* (PRAT e PRMR1) sobre os fragmentos impregnados. Foram escolhidas cepas ATCC e isolados clínicos sensíveis, resistentes ou multirresistentes de cada espécie para o ensaio.

5.10.1 Montagem do experimento

Inicialmente, foram feitos os inóculos bacterianos na escala 0,5 de McFarland, como já descrito anteriormente. Em seguida, foram adicionados 875 μ L de caldo BHI enriquecido com 1% de glicose em cada poço das placas de 24 poços de fundo chato. Com o meio distribuído na placa e os inóculos preparados, colocaram-se, com ajuda de uma pinça estéril, os fragmentos de cateter impregnados em alguns poços e fragmentos não impregnados, porém tratados com clorofórmio, em outros. Esses últimos foram incluídos como controle de crescimento do experimento. Após adicionar os fragmentos, foram pipetados 125 μ L dos inóculos preparados nos seus respectivos poços homogeneizando com cuidado e, em seguida, as placas foram guardadas em incubadora SHAKER SL 222 com rotação de 80 RPM, à temperatura de 37° C, por 48 horas para formação do biofilme.

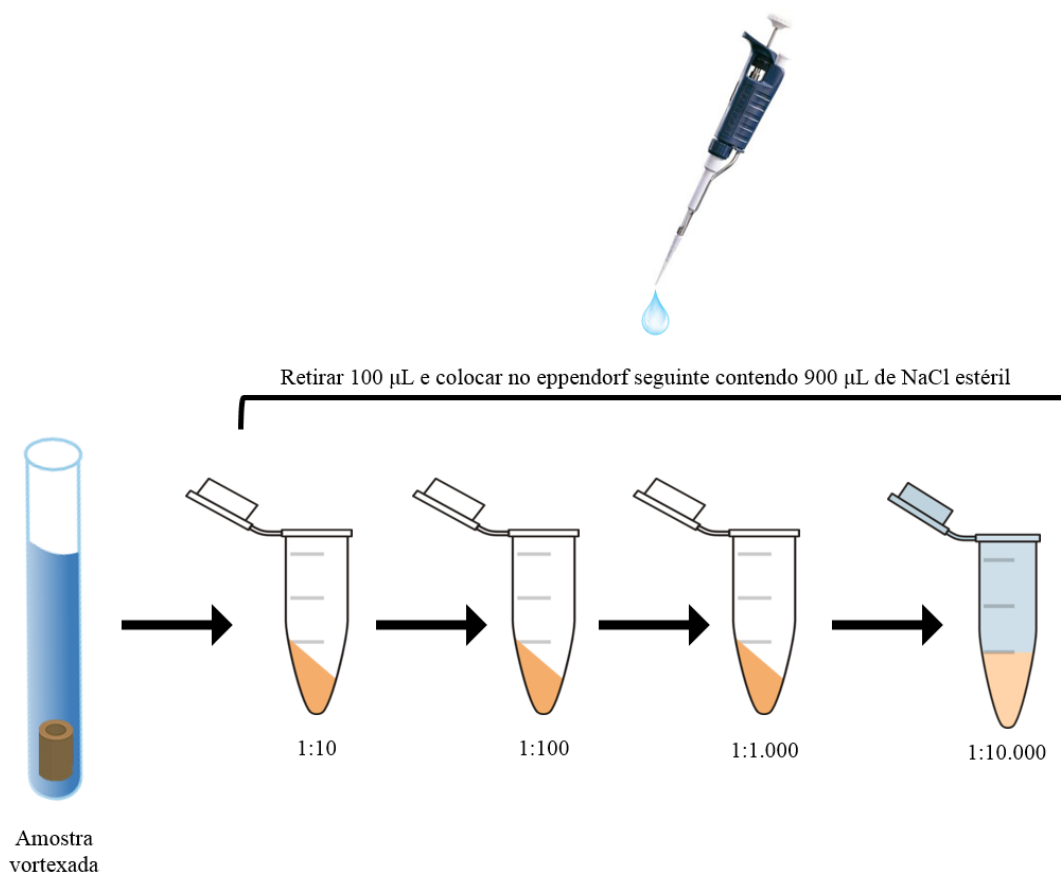
5.10.2 Quantificação e leitura do teste biológico

Passado o tempo de incubação, as placas foram retiradas da estufa e levadas para a cabine de fluxo laminar. Com o auxílio de um pipetador, foi retirado 1 mL de cada poço contendo fragmento. Logo em seguida, foi adicionado e retirado 1mL de salina estéril para lavagem dos poços e esse procedimento foi realizado mais uma vez para retirada das bactérias não aderidas. Feita a lavagem, os fragmentos foram retirados dos

poços e colocados em tubos Falcon de 15mL com 2mL de salina e vortexados por 1,5 minutos, para desprendimento das células do biofilme.

Após todos os tubos serem vortexados, foram realizadas diluições das amostras precedendo o semeio em placa de Petri. De forma resumida, pipetou-se 100 μL do sobrenadante em um microtubo contendo 900 μL de salina estéril, diluindo 1:10 a 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 como demonstra a **figura 5**.

Figura 5 – Processo de diluição das amostras submetidas a agitação para desprendimento do biofilme: Primeiro homogeniza-se a amostra, então, retira-se 100 μL do tubo de hemólise e os transfere para o primeiro microtubo, contendo 900 μL de salina estéril. Posteriormente, homogeniza-se a suspensão bacteriana e transferem-se 100 μL do primeiro microtubo para o segundo e, assim, esse procedimento é realizado até o quarto microtubo. As diluições obtidas nesse processo são de 1:10, 1:100, 1:1.000 e 1:10.000 da suspensão inicial.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Feitas as diluições das amostras, 10 µL das diluições de 1:1.000 e 1:10.000 foram inoculadas em placas de Petri (94x16mm) contendo agar BHI e agar CLED, para contagem de ufc de *P. mirabilis*, semeadas com uma alça de Drigalski e incubadas em estufa bacteriológica a 37 °C, por 24 horas para crescimento das ufc. No dia seguinte, as placas foram retiradas da estufa e a contagem de ufc foi realizada de forma visual.

5.11 Avaliação da ação de antimicrobianos sobre biofilmes maduros *E. coli*, *K. pneumoniae* e *P. mirabilis* formados em fragmentos cateteres impregnados ou não com clorpromazina

Para a realização dessa etapa, o mesmo protocolo descrito acima (**Seção 5.10**) foi realizado, porém meropenem ou ciprofloxacina, na concentração referente a CIM contra cada cepa, foram adicionados aos poços contendo biofilmes maduros formados sobre fragmentos de cateteres. De forma simplificada, o experimento foi montado em duplicata, sendo os primeiros dois poços reservados para ser o controle do experimento, tendo apenas caldo BHI enriquecido com 1% de glicose mais 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 clorpromazina e, por fim, 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.

Após a montagem do ensaio, as placas foram guardadas em incubadora SHAKER SL 222 com rotação de 80 RPM, à temperatura de 37 °C, por 48 horas para formação do biofilme. Passado esse período, foram quantificadas utilizando a mesma metodologia descrita anteriormente (**Seção 5.10.2**).

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

Para a avaliação por microscopia confocal, os biofilmes foram crescidos nas mesmas condições descritas anteriormente (**Seção 5.10**) e (**Seção 5.11**), porém, após 48 h e 72 h, respectivamente, os cateteres foram lavados e colocados em placas de Petri de fundo de lamínula para análise com 200 µL de uma solução preparada com 2 mL de salina mais 3 µL de cada composto do kit LIVE/DEAD® (Thermo Fisher Scientific), sob proteção da luz, segundo a metodologia descrita por Castelo Branco *et al.* (2015). Foram lidos 10 campos por amostra e as amostras foram visualizadas em microscópio

Confocal Nikon C2, a 488 nm para detecção do fluorocromo Syto9, para células vivas, e a 561 nm, e para o fluorocromo iodeto de propídio, que evidencia células mortas e/ou danificadas. Imagens tridimensionais foram coletadas dos biofilmes, a fim de se obterem resultados representativos das amostras (HEYDORN *et al.*, 2000; COLLINS, 2007).

5.13 Análise estatística

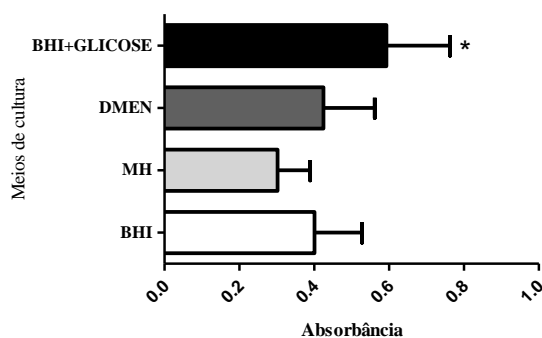
Os dados foram, inicialmente, analisados quanto à simetria, o que revelou que os os mesmos apresentam distribuição assimétrica. Em seguida, para avaliar o efeito da curcumina, do furaneol e da clorpromazina sobre a formação de biofilmes e sobre o biofilme maduro das cepas estudadas, utilizaram-se o teste de Wilcoxon para análises pareadas e o teste de Mann-Whitney para análises não-pareadas. Para avaliar o efeito global da impregnação dos cateteres com clorpromazina e dos antimicrobianos sobre a contagem de ufc bacterianas foi utilizada a análise de variância (ANOVA), seguida do teste *posthoc* de Kruskal-Wallis. Ademais, a análise 2-way-ANOVA foi realizada para avaliar o efeito dos tratamentos (cateter impregnado, antimicrobiano e cateter impregnado + antimicrobiano) sobre cada cepa, individualmente. Para todos os testes aplicados, valores de $P < 0,05$ permitiram tirar conclusões significativas.

6. RESULTADOS

6.1 Avaliação da metodologia *in vitro* para induzir a formação de biofilmes em placas de microtitulação

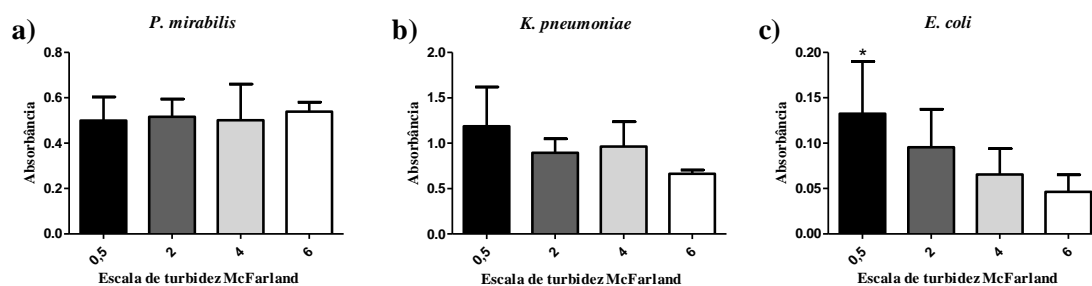
O meio Brain Heart Infusion (BHI) enriquecido com 1% de glicose foi escolhido para os experimentos, pois se mostrou estatisticamente mais eficaz, promovendo uma melhor formação de biofilme, quando comparado ao Dulbecco MEM (DMEM), Mueller Hinton (MH) e BHI não enriquecido com glicose (**Gráfico 1**).

Gráfico 1 – Avaliação da formação de biofilmes por *Escherichia coli* (n=2), *Klebsiella pneumoniae* (n=2) e *Proteus mirabilis* (n=2) utilizando diferentes meios de cultura. Dados expressos como média e desvio padrão da absorbância da biomassa, mensurada pela coloração com cristal violeta.



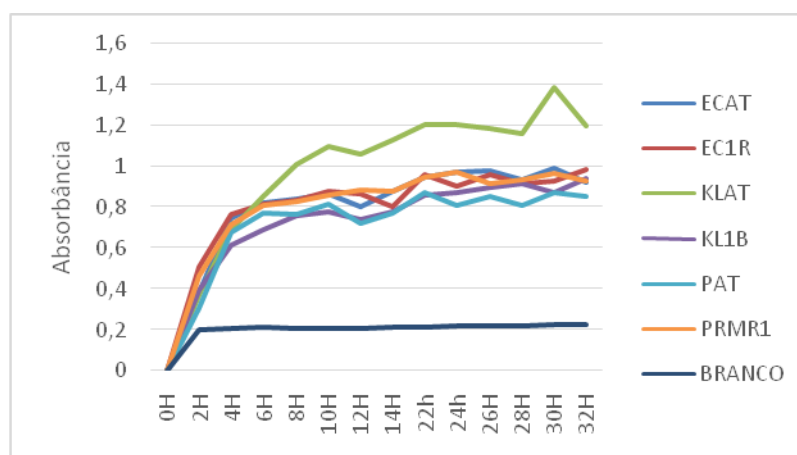
Na avaliação da turbidez do inóculo, os isolados de *K. pneumoniae* e *P. mirabilis* apresentaram uma boa formação de biofilmes em todas as concentrações testadas, como mostra a **Gráfico 2**, porém, os isolados de *E. coli* apresentaram um melhor desempenho, quando utilizado inóculo na concentração referente à escala 0,5 de McFarland. Para confirmar esse resultado, todos os isolados de *E. coli* foram submetidos a essa avaliação (n= 6), demonstrando que, com inóculo na concentração de 0,5 McFarland, a formação de biofilmes é significativamente maior quando comparada as outras escalas testadas. Por esse motivo, a turbidez escolhida foi de 0,5 para seguimento da pesquisa, por promover o desenvolvimento dos biofilmes (**Gráfico 2**).

Gráfico 2 – Avaliação da formação de biofilmes por *Escherichia coli* (n=6), *Klebsiella pneumoniae* (n=2) e *Proteus mirabilis* (n=2) em diferentes concentrações de inóculo, em caldo BHI acrescido de glicose 1%. Dados expressos como média e desvio padrão da absorbância da biomassa, mensurada pela coloração com cristal violeta. a) Isolados de *Proteus mirabilis*, b) Isolados de *Klebsiella pneumoniae* e c) Isolados de *Escherichia coli*.



Quanto ao tempo de crescimento para o preparo do inóculo para a formação de biofilmes, foi realizado um teste de curva de crescimento para avaliar esse aspecto (**Gráfico 3**). Os inóculos preparados com 24 horas de incubação, quando os micro-organismos já se encontram na fase estacionária, mostraram-se mais eficazes na promoção da formação de biofilmes.

Gráfico 3 – Curva de crescimento bacteriano dos isolados incluídos no estudo.



6.2 Concentração inibitória mínima (CIM) do inibidor de bomba de efluxo clorpromazina, dos moduladores de *quorum sensing* e dos antimicrobianos contra os isolados de *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* e *Proteus mirabilis*

A clorpromazina apresentou CIMs que variaram de 39,06 - 78,12, 39,06 - 156,25 e 78,12 - 625 µg/mL contra *E. coli*, *K. pneumoniae* e *P. mirabilis*, respectivamente. Por outro lado, curcumina e furaneol não apresentaram atividade inibitória contra os isolados testados. Quanto aos antimicrobianos, as CIMs encontradas foram de 0,006 - >32 µg/mL para ciprofloxacina e 0,06 - > 16 µg/mL para meropenem (**Tabela 2**).

Tabela 2 – Sensibilidade de *Escherichia coli* (n=6), *Klebsiella pneumoniae* (n=6) e *Proteus mirabilis* (n=6) a clorpromazina (CPZ), curcumina (CUR), furaneol (FUR), ciprofloxacina (CIP) e meropenem (MER).

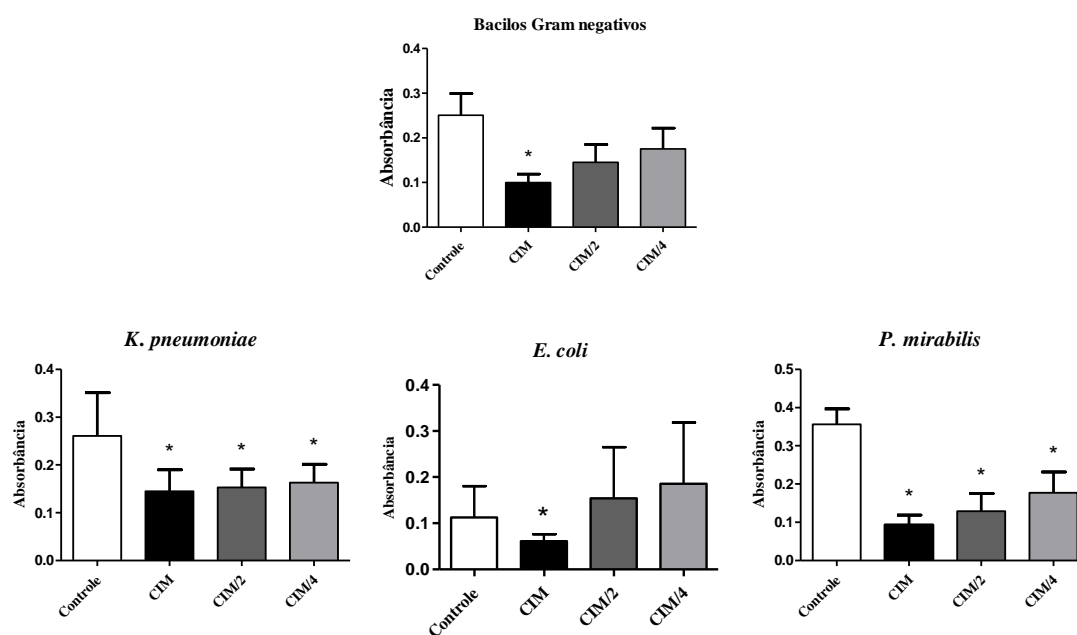
Bactéria	Origem	Código	CIM				
			CPZ µg/mL	CUR µM	FUR µM	CIP µg/mL	MER µg/mL
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 25922	ECAT	39,06	>512	>5000	0,008	0,0625
<i>Escherichia coli</i>	Urina	ECS5	78,12	>512	>5000	>32	0,25
<i>Escherichia coli</i>	Urina	ECS8	39,06	>512	>5000	0,03125	0,25
<i>Escherichia coli</i>	Cepa padrão	EAEC	39,06	>512	>5000	0,0625	0,125
<i>Escherichia coli</i>	Urina	EC1R	39,06	>512	>5000	32	0,125
<i>Escherichia coli</i>	Urina	EC2R	78,12	>512	>5000	16	0,125
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	ATCC 600703	KLAT	156,25	>512	>5000	0,25	0,125
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Urina	KL1S	78,12	>512	>5000	0,125	0,125
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Urina	KL2S	78,12	>512	>5000	>32	0,125
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Urina	KL1B	39,06	>512	>5000	>32	>16
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Urina	KL2B	39,06	>512	>5000	>32	0,125
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Urina	KL2M	39,06	>512	>5000	0,03125	0,25
<i>Proteus mirabilis</i>	ATCC 29906	PRAT	625	>512	>5000	0,03125	0,5
<i>Proteus mirabilis</i>	Urina	PRS1	625	>512	>5000	0,03125	1
<i>Proteus mirabilis</i>	Urina	PRS4	78,12	>512	>5000	0,03125	1
<i>Proteus mirabilis</i>	Urina	PRS6	625	>512	>5000	0,5	1
<i>Proteus mirabilis</i>	Urina	PRMR1	625	>512	>5000	16	1
<i>Proteus mirabilis</i>	Urina	PRMR2	625	>512	>5000	0,25	16

6.3 Efeito do inibidor de bomba de efluxo clorpromazina e dos moduladores de *quorum sensing* curcumina e furaneol sobre a formação de biofilmes por *E. coli*, *K. pneumoniae* e *P. mirabilis*

Foi utilizado para todos os isolados a CIM encontrada no teste de sensibilidade à clorpromazina (**Tabela 2**) e duas concentrações subinibitórias (CIM, CIM/2 e CIM/4). A clorpromazina, na maior concentração, reduziu significativamente, em 53,92%, a biomassa dos biofilmes em formação, em relação ao controle de crescimento (**Gráfico 4**).

Separando a análise por espécies, observou-se um desvio padrão (DP) elevado, em decorrência da heterogeneidade de comportamento dos diferentes isolados, tanto no tocante à habilidade de formar biofilmes, quanto na resposta aos compostos. Observou-se que a heterogeneidade da habilidade de formação de biofilmes ocorre não só entre espécies, como também entre cepas. Mesmo em concentrações inibitórias, a CPZ inibe a formação de biofilmes por *K. pneumoniae* e *P. mirabilis*, embora para a *E. coli*, a inibição aconteceu apenas na maior concentração. Entretanto, de maneira geral, a clorpromazina inibe a formação de biofilmes (**Gráfico 4**).

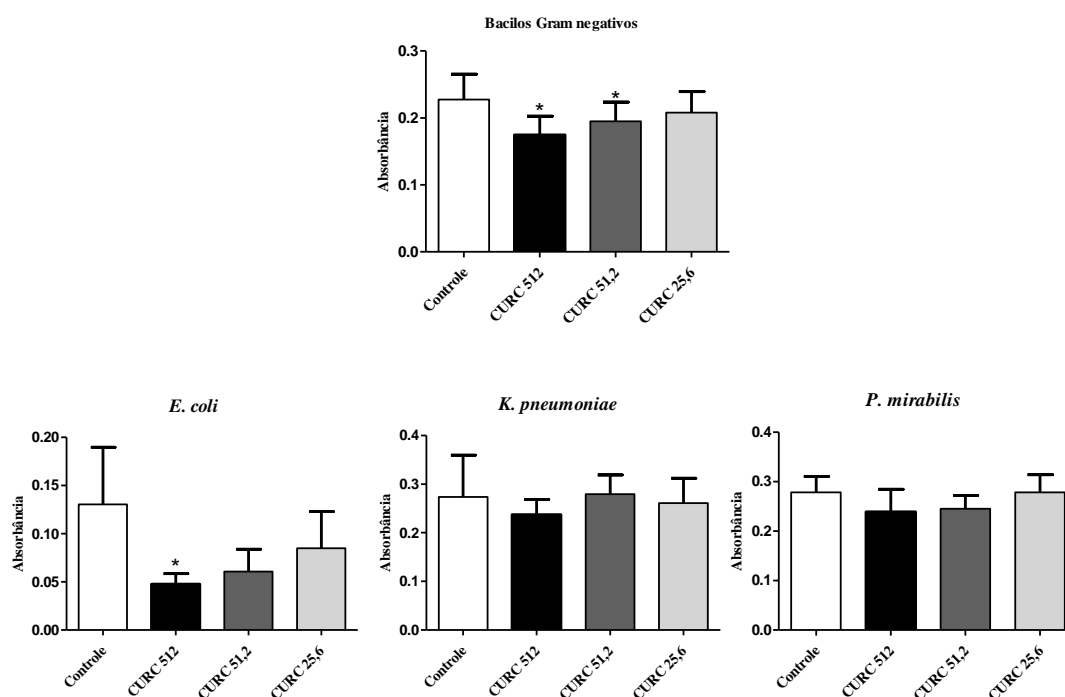
Gráfico 4 – Efeito do inibidor de bomba de efluxo clorpromazina (CPZ) sobre a formação de biofilmes por *Escherichia coli* (n=6), *Klebsiella pneumoniae* (n=6) e *Proteus mirabilis* (n=6). Dados expressos como média e desvio padrão da absorbância da biomassa, mensurada pela coloração com cristal violeta.



As maiores concentrações utilizadas para os ensaios com a curcumina e furaneol foram de 512 μM e 5.000 μM , respectivamente, por não terem sido encontradas as CIMs para cada composto no teste de sensibilidade.

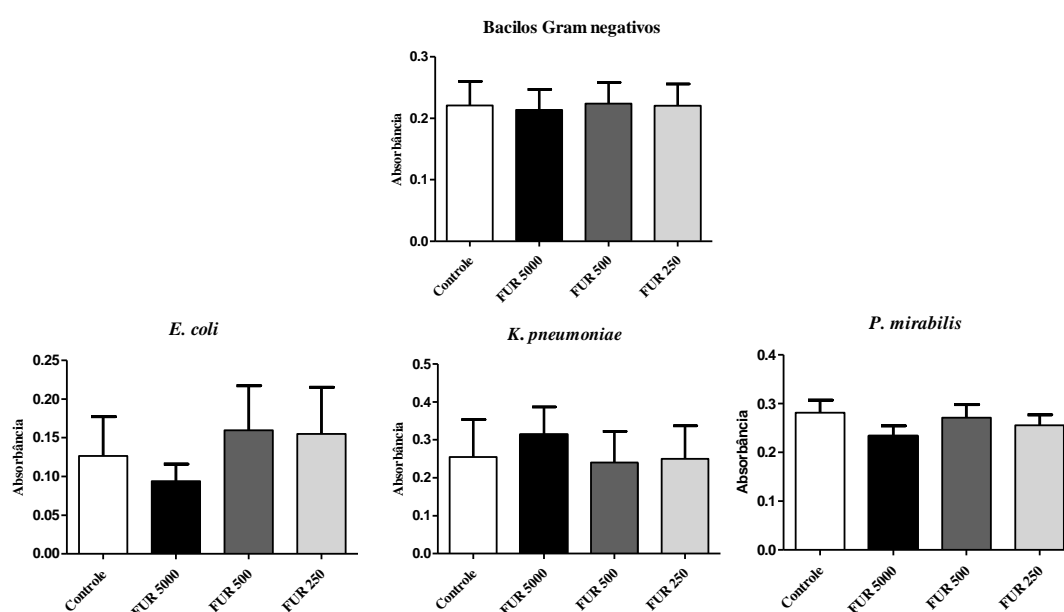
De modo geral, o modulador de *quorum sensing* curcumina inibiu a formação de biofilmes nas concentrações de 512 e de 51,2 μM . Porém, só foi significativamente efetiva contra *E. coli* na maior concentração de curcumina, quando comparados ao controle. Os demais não demonstraram redução significativa ou demonstraram uma discreta redução (**Gráfico 5**).

Gráfico 5 – Efeito do modulador de *quorum sensing* curcumina (CUR) sobre a formação de biofilmes de *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* e *Proteus mirabilis*. Dados expressos como média e desvio padrão da absorbância da biomassa, mensurada pela coloração com cristal violeta.



Já com o modulador de *quorum sensing* furaneol, de maneira geral, não foi observada redução estatisticamente significativa. Avaliando as espécies de forma isolada, o furaneol confirmou o que já foi demonstrado na avaliação geral, nenhuma redução significativa foi observada (**Gráfico 6**).

Gráfico 6 – Avaliação do modulador de *quorum sensing* furaneol (FUR) sobre a formação de biofilmes de *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* e *Proteus mirabilis*. Dados expressos como média e desvio padrão da absorbância da biomassa, mensurada pela coloração com cristal violeta.

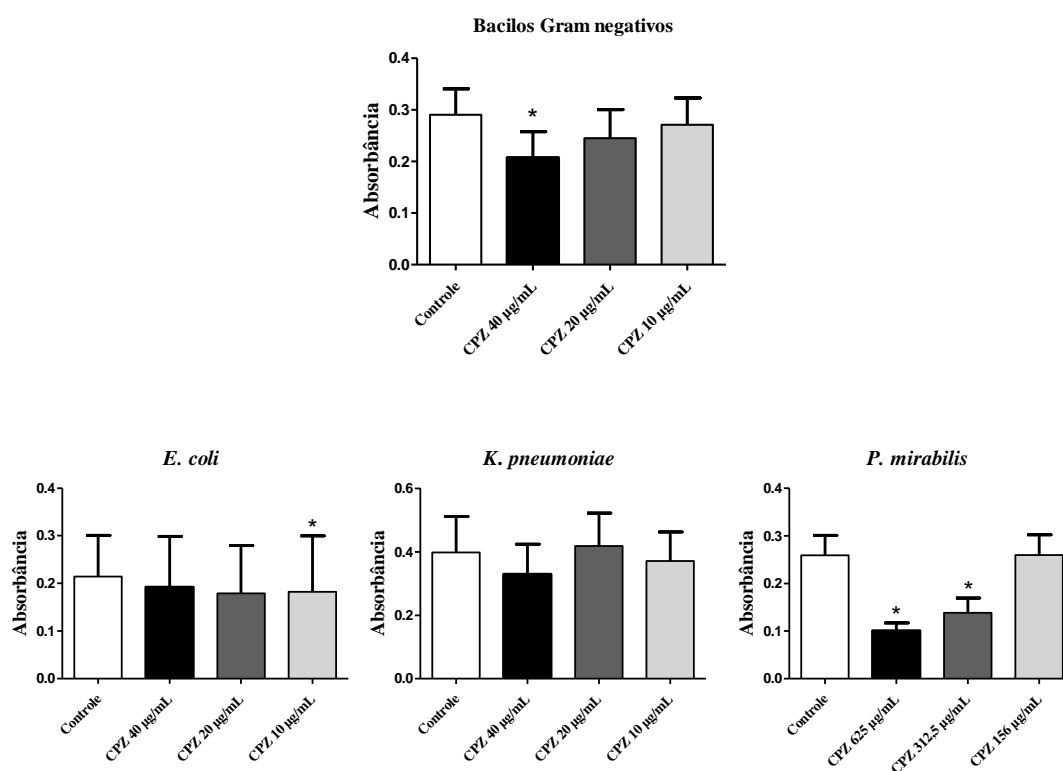


6.4 Avaliação do inibidor de bomba de efluxo clorpromazina e dos moduladores de *quorum sensing* curcumina e furaneol sobre biofilmes maduros de *E. coli*, *K. pneumoniae* e *P. mirabilis*

A mesma concentração utilizada para avaliar a ação do composto sobre a formação de biofilmes pelos isolados foi também utilizada para avaliar sua ação sobre biofilmes maduros. Para a clorpromazina, de maneira geral, a maior concentração do composto causou uma redução significativa ($P < 0,05$) de 28,57% da biomassa dos biofilme maduros, porém, avaliando isoladamente cada espécie, os isolados de *E. coli* demonstraram uma redução significativa na menor concentração (10 $\mu\text{g/mL}$) e os isolados de *P. mirabilis* demonstraram, tanto na maior concentração (625 $\mu\text{g/mL}$), quanto na concentração intermediária (312,5 $\mu\text{g/mL}$), uma redução estatisticamente

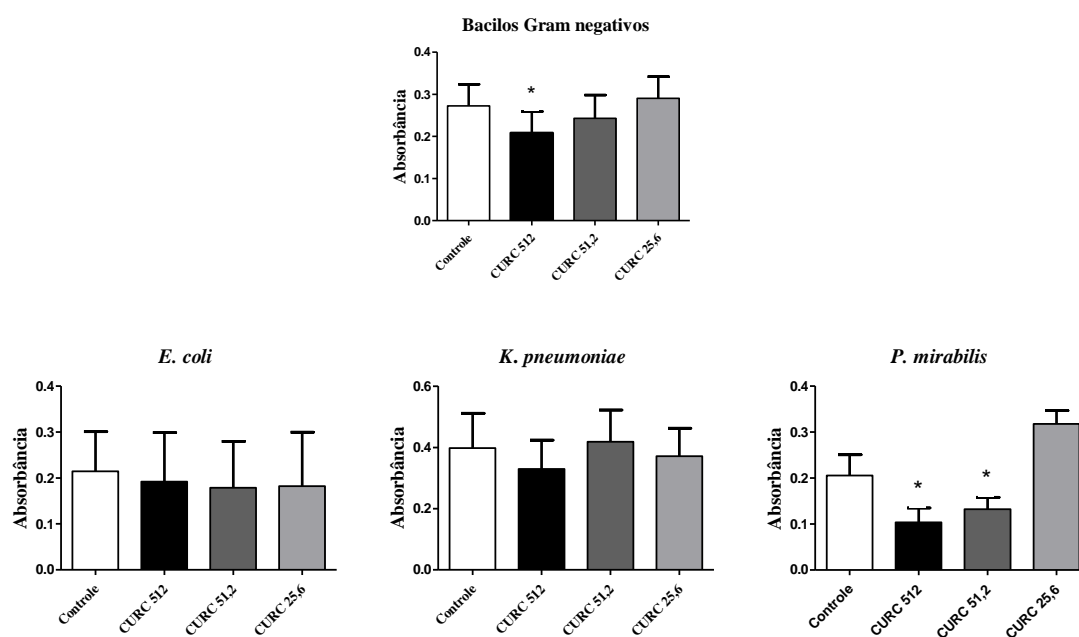
significativa da biomassa, quando comparados ao controle. Por outro lado, a menor concentração (156 $\mu\text{g/mL}$) utilizada contra os biofilmes de *P. mirabilis* causou o contrário do observado nas maiores concentrações, não apresentou diferença quando comparada ao controle (**Gráfico 7**).

Gráfico 7 – Efeito do inibidor de bomba de efluxo clorpromazina (CPZ) sobre biofilmes maduros de *Escherichia coli* (n=6), *Klebsiella pneumoniae* (n=6) e *Proteus mirabilis* (n=6). Dados expressos como média e desvio padrão da absorbância da biomassa, mensurada pela coloração com cristal violeta.



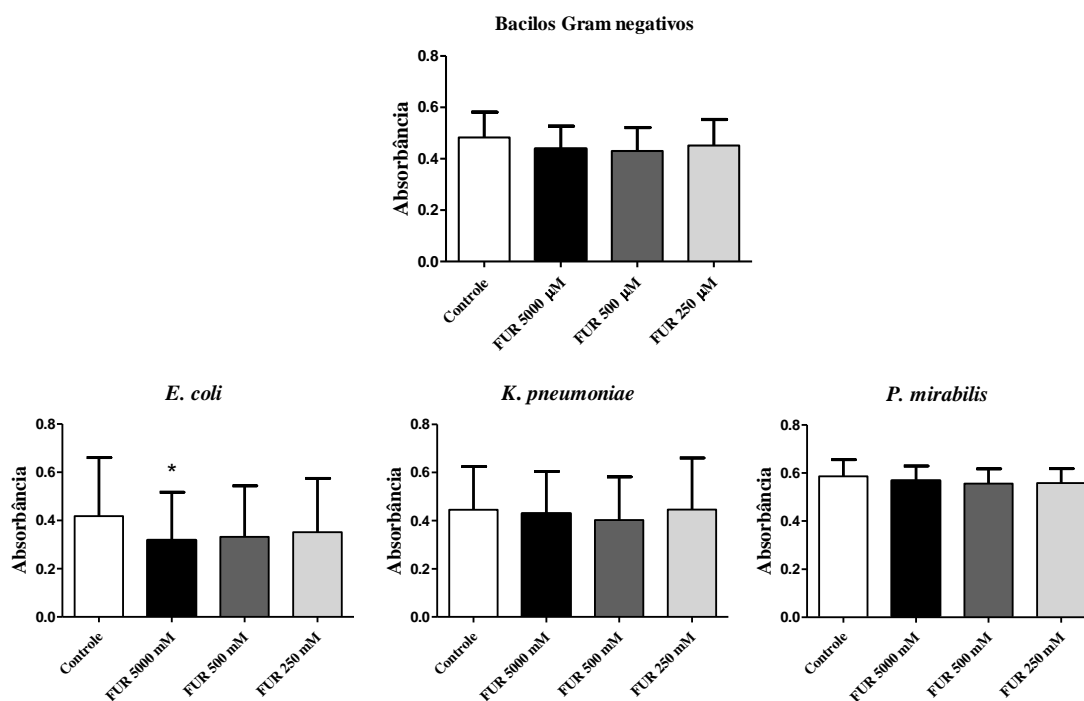
Para os compostos curcumina e furaneol, também foram utilizadas as mesmas concentrações. De maneira geral, a curcumina causou uma redução significativa ($P < 0,05$) na maior concentração utilizada ($512 \mu\text{M}$) quando comparada ao controle de crescimento (**Gráfico 8**). Quando analisamos as espécies separadamente, observaram-se diferenças somente para *P. mirabilis*, de forma que a curcumina reduziu o biofilme tanto na maior concentração ($512 \mu\text{M}$), quanto na concentração intermediária ($51,2 \mu\text{M}$). Os isolados de *E. coli* e *K. pneumoniae* não apresentaram redução.

Gráfico 8 – Efeito do modulador de *quorum sensing* curcumina (CUR) sobre biofilmes maduros de *Escherichia coli* ($n=6$), *Klebsiella pneumoniae* ($n=6$) e *Proteus mirabilis* ($n=6$). Dados expressos como média e desvio padrão da absorbância da biomassa, mensurada pela coloração com cristal violeta.



Por último, o furaneol não induziu redução significativa na biomassa dos biofilmes, após a exposição às concentrações testadas, quando comparadas ao controle (**Gráfico 9**), porém, separando e analisando as espécies isoladamente, percebemos uma redução significativa, somente para os isolados de *E. coli*, após exposição à maior concentração (5000 μ M).

Gráfico 9 – Efeito do modulador de *quorum sensing* furaneol (FUR) sobre biofilmes maduros de *Escherichia coli* (n=6), *Klebsiella pneumoniae* (n=6) e *Proteus mirabilis* (n=6). Dados expressos como média e desvio padrão da absorbância da biomassa, mensurada pela coloração com cristal violeta.



6.5 Concentração inibitória mínima em biofilme (CIMB) e concentração eliminatória mínima (CEMB) do inibidor de bomba de efluxo clorpromazina, dos moduladores de *quorum sensing* e dos antimicrobianos aos isolados do estudo

A clorpromazina apresentou CEMBs que variaram de 312,5 - 625 µg/mL contra biofilmes de *E. coli*, *K. pneumoniae* e de 312,5 - 1.250 µg/mL contra biofilmes de *P. mirabilis*. O meropenem apresentou CEMBs que variaram de 32 - >128µg/mL contra biofilmes de *E. coli*, *K. pneumoniae* e contra *P. mirabilis* o CEMB foi maior >128µg/mL para todos os isolados (**Tabela 3**).

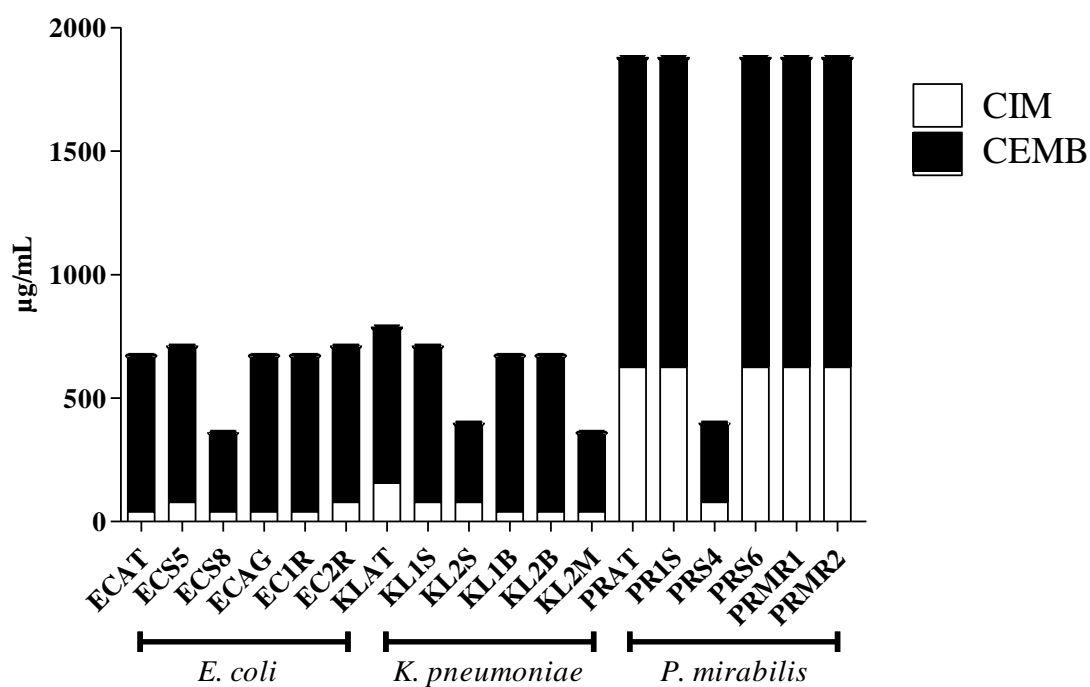
Tabela 3 – Sensibilidade dos biofilmes de *Escherichia coli* (n=6), *Klebsiella pneumoniae* (n=6) e *Proteus mirabilis* (n=6) a clorpromazina (CPZ), ciprofloxacina (CIP) e meropenem (MER).

Bactéria ¹	Origem	Código	CIMB			CEMB	
			CIP	MER	CPZ	CIP	MER
			µg/mL	µg/mL	µg/mL	µg/mL	µg/mL
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 25922	ECAT	-	32	625	78,12	64
<i>Escherichia coli</i>	Urina	ECS5	128	-	625	625	32
<i>Escherichia coli</i>	Urina	ECS8	128	16	312,5	312,5	32
<i>Escherichia coli</i>	Cepa padrão	EAEC	128	128	625	312,5	>128
<i>Escherichia coli</i>	Urina	EC1R	-	-	625	>625	>128
<i>Escherichia coli</i>	Urina	EC2R	-	-	625	>625	>128
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	ATCC 600703	KLAT	-	-	625	>625	>128
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Urina	KL1S	-	16	625	>625	32
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Urina	KL2S	-	-	312,5	>625	>128
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Urina	KL1B	-	-	625	>625	>128
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Urina	KL2B	-	128	625	>625	>128
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Urina	KL2M	-	128	312,5	>625	>128
<i>Proteus mirabilis</i>	ATCC 29906	PRAT	-	-	1.250	>625	>128
<i>Proteus mirabilis</i>	Urina	PRS1	-	-	1.250	>625	>128
<i>Proteus mirabilis</i>	Urina	PRS4	-	-	312,5	>625	>128
<i>Proteus mirabilis</i>	Urina	PRS6	-	-	1.250	>625	>128
<i>Proteus mirabilis</i>	Urina	PRMR1	-	-	1.250	>625	>128
<i>Proteus mirabilis</i>	Urina	PRMR2	-	-	1.250	>625	>128

- Não apresentou atividade inibitória mínima.

As CEMBs da clorpromazina foram, pelo menos, 2x maior que as CIMs na forma planctônica de cada isolado testado. A maior diferença foi entre os isolados de *E. coli* e *K. pneumoniae*, apresentando CEMBs até 93,7% superiores as CIMs (**Gráfico 10**).

Gráfico 10 – Concentrações inibitórias mínimas (CIMs) e concentrações eliminatórias mínimas sobre o biofilme (CEMBs) da clorpromazina contra isolados de *Escherichia coli* (n=6), *Klebsiella pneumoniae* (n=6) e *Proteus mirabilis* (n=6).



6.6 Teste de toxicidade

Os compostos curcumina e clorpromazina não apresentaram toxicidade em nenhuma das concentrações testadas, como demonstra a tabela abaixo (**Tabela 4**). O furaneol foi o único composto que demonstrou toxicidade, apresentando um CI_{50} de 61,82 μ M.

Tabela 4 – Atividade citotóxica *in vitro* dos compostos. Valores de CI_{50} e o intervalo de confiança de 95% realizado pelo teste de rezasurina na linhagem de fibroblasto de pulmão de origem humana após 72 horas de exposição.

COMPOSTO	CONCENTRAÇÕES	LINHAGEM	IC50 μ M/ μ g/ml
FURANEOL	78,125 – 5000 μ M	MRC5	61.82 μ M (40.80 – 78.69)
CURCUMINA	8 – 512 μ M	MRC5	ND
CLOPROMAZINA	32 – 2048 μ g/mL	MRC5	ND

ND: Não determinado

6.7 Impregnação dos fragmentos de cateter com clorpromazina, curcumina e furaneol

Após o processo de impregnação, os fragmentos foram encaminhados para análise na Central Analítica da UFC. Nas imagens obtidas com o MEV, é possível notar uma diferença na superfície dos cateteres impregnados quando comparados ao cateter não submetido a impregnação, mas dilatados com o clorofórmio (**Figura 5**). Os gráficos obtidos com o EDS (**Figura 6**) mostram a presença de uma grande quantidade de carbono, elemento abundante nos compostos utilizados, aderida à superfície, em relação à quantidade do mesmo elemento no gráfico do controle.

Figura 6 – Imagens obtidas por MEV dos fragmentos de cateter impregnados ou não com clorpromazina, curcumina e furaneol: a) Fragmentos dilatados com clorofórmio, não impregnados (Controle), b) Fragmentos impregnados com CUR (1.024 μM), c) Fragmentos impregnados com furaneol (10.000 μM) e d) Fragmentos impregnados com clorpromazina (400 $\mu\text{g/mL}$). Observar que os fragmentos de cateteres impregnados com curcumina (b) e furaneol (c) apresentam uma maior irregularidade na superfície quando comparados com o controle (a), já os fragmentos impregnados com clorpromazina (d), possuem uma maior similaridade de superfície com o controle (a).

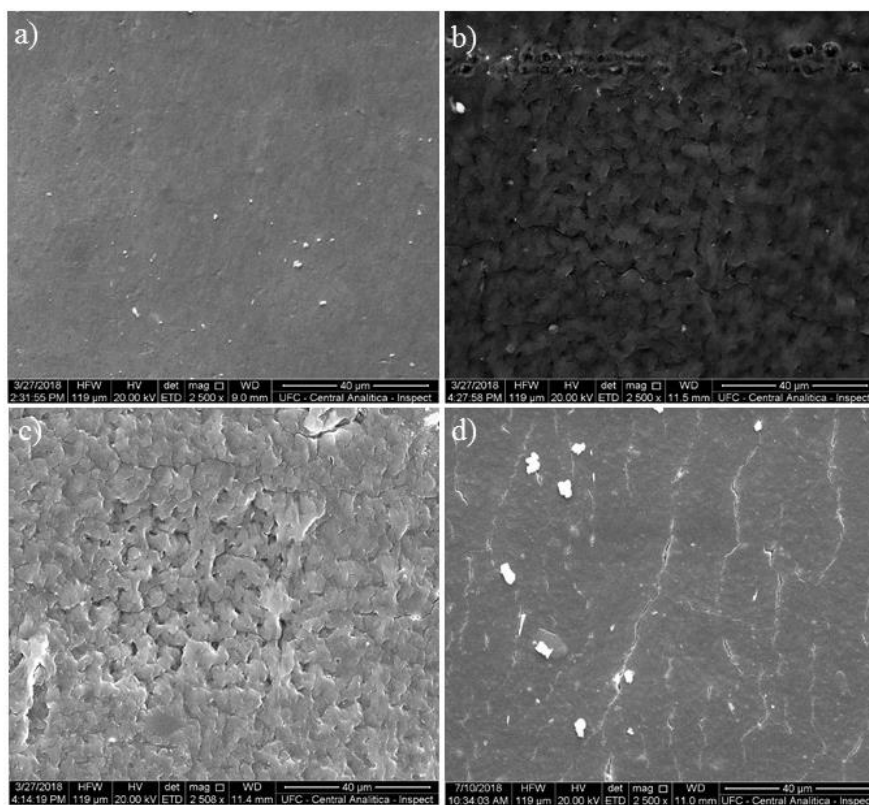
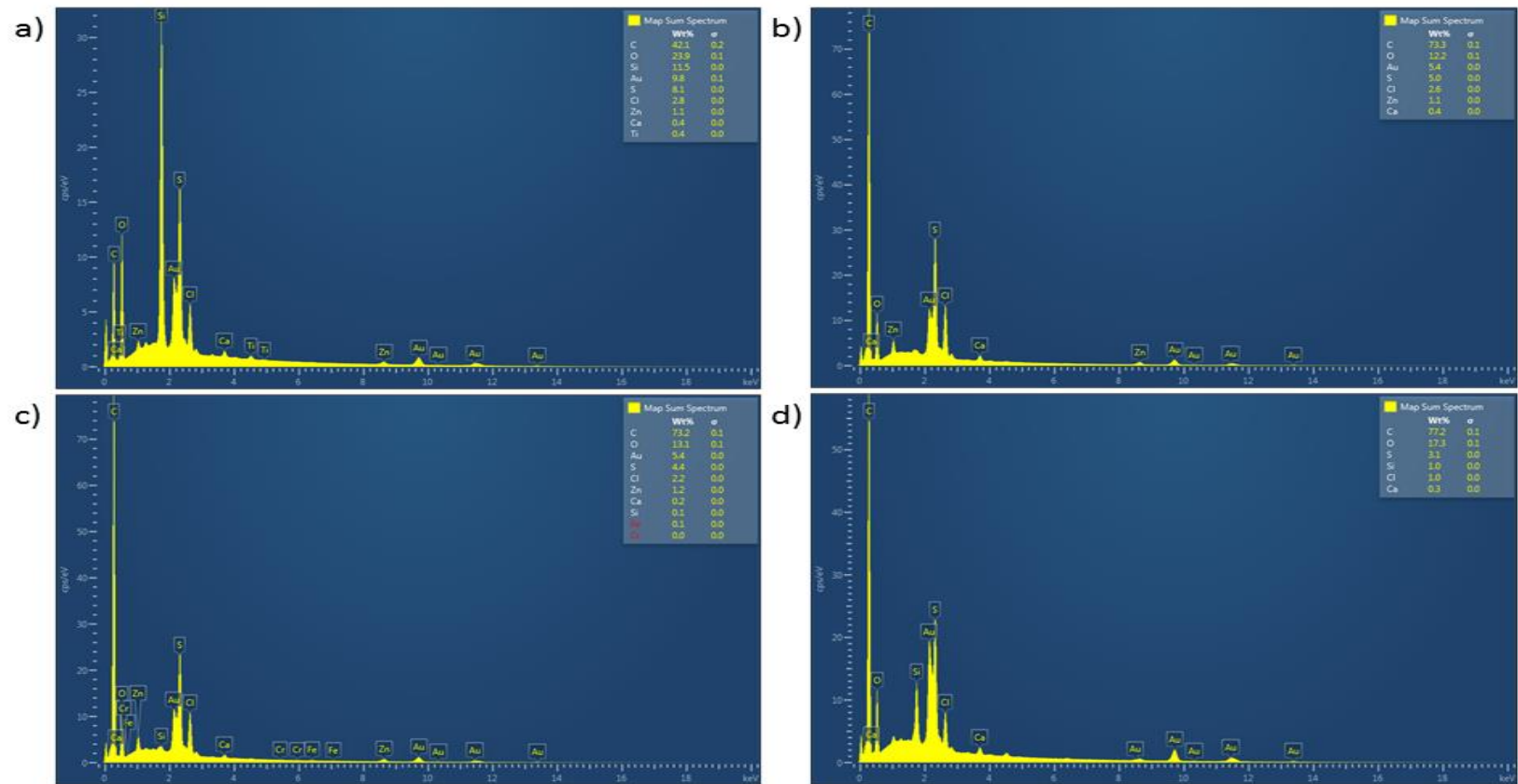


Figura 7 – Imagens dos gráficos obtidos a partir da análise das imagens geradas pelo MEV dos fragmentos de cateter impregnados ou não com clorpromazina, curcumina e furaneol: a) Fragmentos dilatados com clorofórmio, mas não impregnados (controle), b) Fragmentos impregnados com curcumina, c) Fragmentos impregnados com furaneol e d) Fragmentos impregnados com clorpromazina. Observar a disparidade do pico do carbono dos gráficos b, c e d quando comparados com o controle (a), indicando uma maior presença de carbono na superfície dos fragmentos impregnados.



O composto utilizado se distribuiu por todo o material durante o processo e não só na superfície. Porém, diferente do outro grupo de pesquisadores (FISHER *et al.*, 2015), conseguimos observar a impregnação da superfície dos fragmentos com auxílio do EDS associado ao MEV e, também, cortando os cateteres pós-impregnação (**Figuras 8 e 9**), pois, graças a cor característica de um dos compostos, a curcumina, a visualização da impregnação se tornou possível a olho nu para esse composto.

Figura 8 – Imagens representativas dos fragmentos de cateter impregnados com curcumina e furaneol: a) Fragmentos dilatados com clorofórmio, mas não impregnados (controle), b) Fragmentos impregnado com furaneol (esquerda) e curcumina (direita), observar a coloração laranja do cateter impregnado com curcumina.

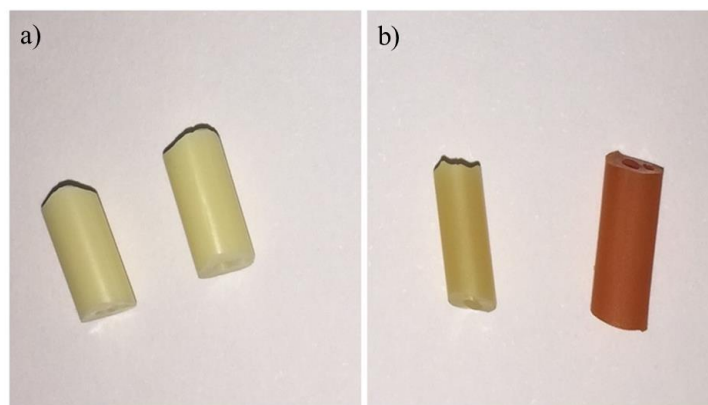
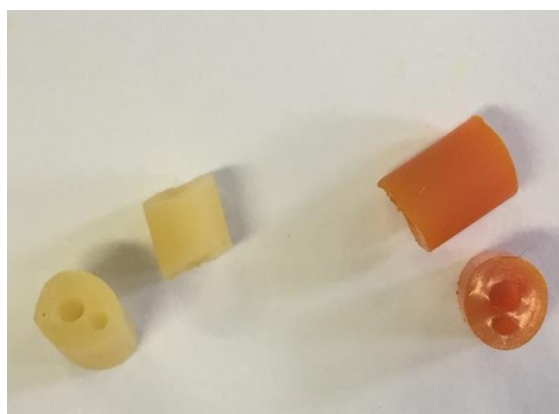


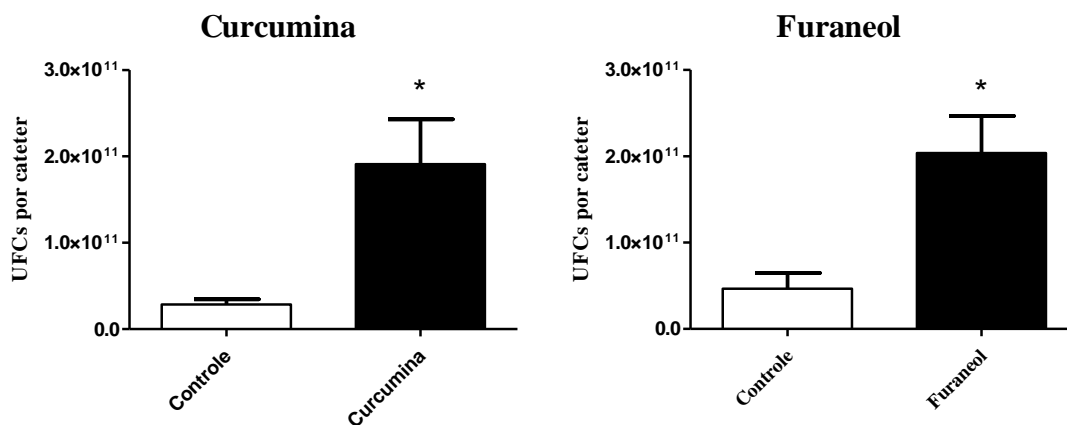
Figura 9 – Imagens representativas dos fragmentos de cateter impregnados com furaneol e curcumina, respectivamente, cortados transversalmente.



6.8 Ação do inibidor de bomba de efluxo clorpromazina e dos moduladores de *quorum sensing* curcumina e furaneol, impregnados em fragmentos de cateter, na formação de biofilmes por *E. coli*, *K. pneumoniae* e *P. mirabilis*

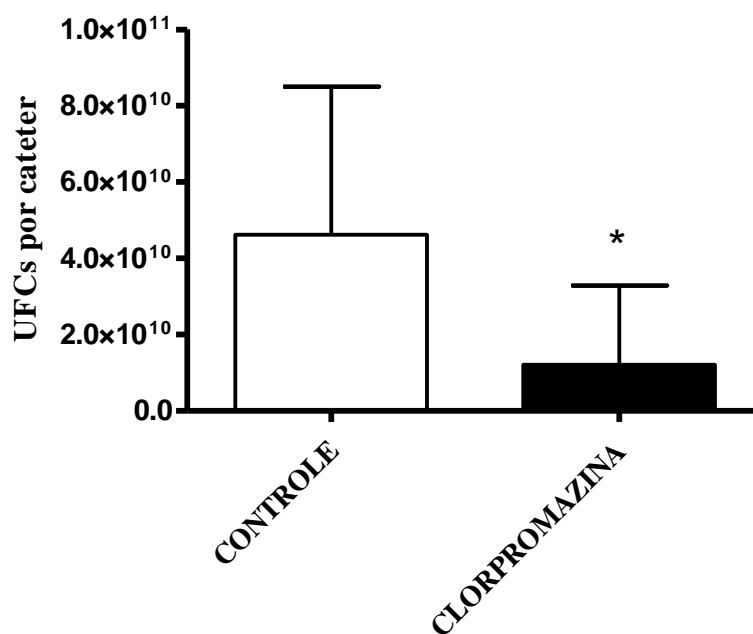
A curcumina e o furaneol promoveram uma maior formação de biofilme nos fragmentos impregnados, quando comparados ao controle, em todas as espécies (Gráfico 11).

Gráfico 11 – Efeito da impregnação de cateteres demora com curcumina e furaneol sobre a formação de biofilmes por *E. coli*, *K. pneumoniae* e *P. mirabilis*. Dados expressos como média e desvio padrão da contagem de ufc's por cateter de todos isolados.



A clorpromazina reduziu significativamente ($P < 0,05$) a formação de biofilmes nos fragmentos impregnados, quando comparados ao controle não impregnado (**Gráfico 12**).

Gráfico 12 – Efeito da impregnação de cateteres de demora com clorpromazina sobre a formação de biofilmes por *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* e *Proteus mirabilis*, isoladamente. Dados expressos como média e desvio padrão da contagem de ufc's por cateter.



Em alguns casos, a CPZ inibiu totalmente a formação de biofilmes, como nos isolados de *E. coli* (ECAT e EAEC) e em um isolado do *P. mirabilis* (PRAT), como demonstrado pela redução significativa de 100% na contagem, conforme expressas no gráfico (**Gráficos 13**) e visualizadas nas imagens abaixo (**Figura 10**). Os três isolados de *K. pneumoniae* incluídos no ensaio apresentaram diferentes resultados, a cepa ATCC (KLAT) não demonstrou redução da contagem em nenhuma das diluições, já o isolado clínico sensível (KL1S) e o isolado clínico multirresistente (KL2M) demonstraram uma redução estatisticamente significativa nas diluições da suspensão bacteriana do fragmento impregnado quando comparado ao controle não impregnado.

Gráfico 13 – Efeito da impregnação de cateteres de demora com clorpromazina sobre a formação de biofilmes por *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* e *Proteus mirabilis*. Dados expressos como média e desvio padrão da contagem de ufc's por cateter em porcentagem.

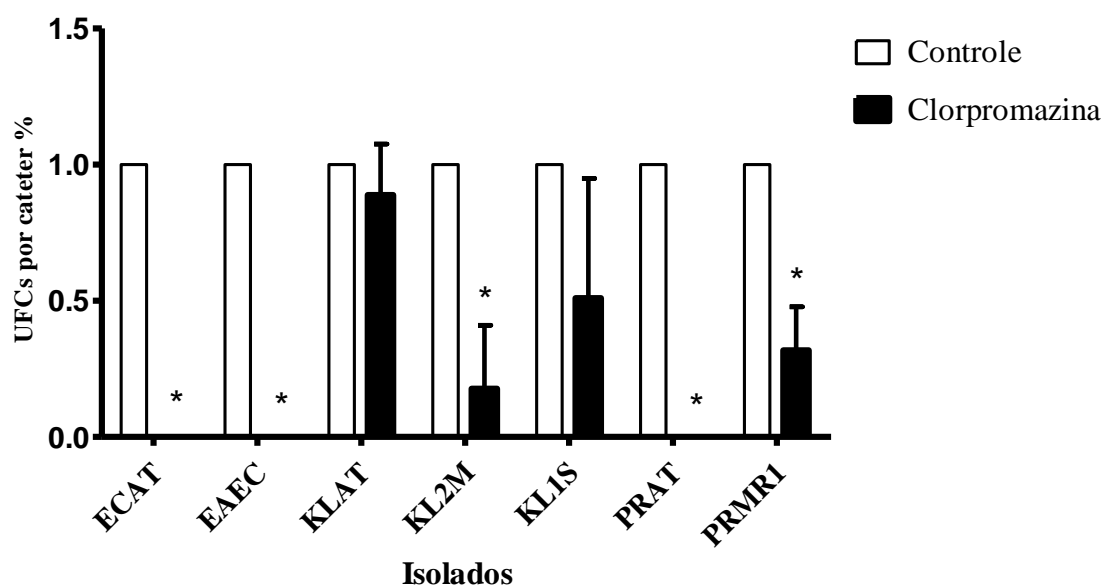
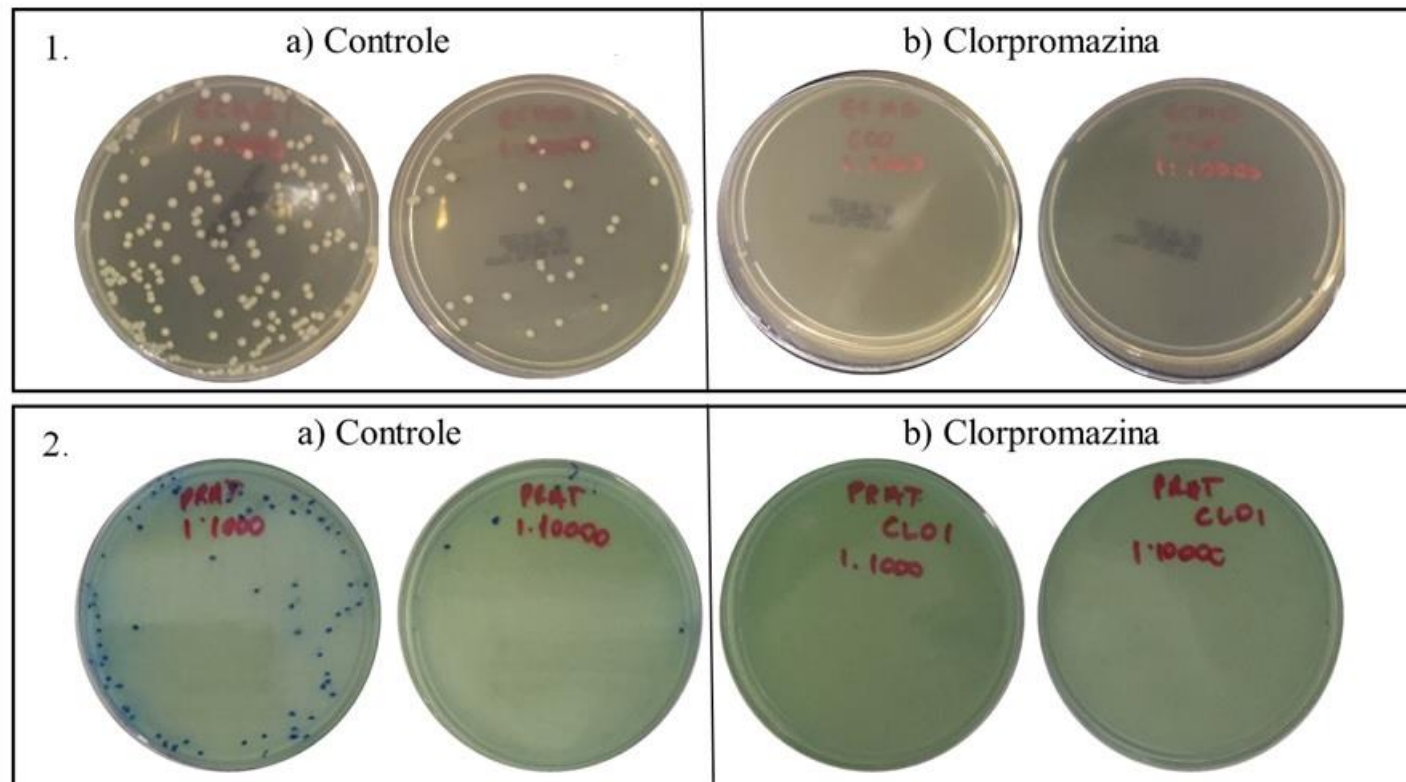


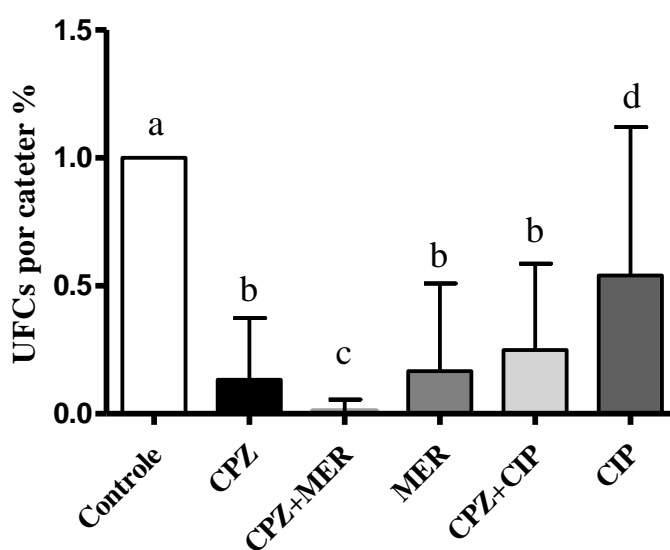
Figura 10 – Imagens representativas da contagem de unidades formadoras de colônias (ufc) por fragmentos de cateter impregnados com clorpromazina (400 µg/mL) ou não impregnados (controle). 1) Contagem de ufc de *Escherichia coli* em fragmento de cateter não impregnado (a) e impregnado (b), nas diluições 1:1.000 e 1:10.000, respectivamente. 2) Contagem de ufc de *Proteus mirabilis* em fragmento de cateter não impregnado (a) e impregnado (b), nas diluições 1:1.000 e 1:10.000, respectivamente. Observar que em todas as diluições dos fragmentos impregnados (b) a inibição é total quando comparada ao controle (a).



6.9 Ação de antimicrobianos sobre biofilmes maduros de *E. coli*, *K. pneumoniae* e *P. mirabilis* formados em fragmentos de cateteres impregnados ou não com clorpromazina

A clorpromazina, impregnada nos fragmentos de cateter, reduz a formação de biofilmes, mas na presença de antimicrobianos, a redução é ainda maior, como podemos observar no **Gráfico 14**. O meropenem, no meio de cultura com fragmentos não impregnados, tem um efeito estatisticamente semelhante com o da clorpromazina impregnada no cateter. Entretanto, quando colocado em contato com biofilmes formados sobre o cateter impregnado com clorpromazina, esse efeito é potencializado e uma maior redução de ufc é observada. Já a ciprofloxacina, no meio de cultura com fragmentos não impregnados, reduz significativamente os biofilmes, quando comparada ao controle, mas a ciprofloxacina, no cateter impregnado com clorpromazina, apresenta uma atividade antimicrobiana mais acentuada, se assemelhando àquela do meropenem sobre o cateter não impregnado.

Gráfico 14 – Efeito de antimicrobianos meropenem (MER) e ciprofloxacina (CIP) sobre biofilmes maduros de *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* e *Proteus mirabilis* formados em fragmentos cateteres impregnados ou não com clorpromazina (CPZ). Dados expressos como média e desvio padrão da contagem de ufc's relativa ao controle (cateter não impregnado, sem antimicrobiano). Letras diferentes representam resultados estatisticamente distintos.



6.10 Análise da microscopia confocal dos biofilmes de *E. coli*, *K. pneumoniae* e *P. mirabilis* formados em fragmentos de cateteres impregnados com clorpromazina, combinados ou não com antimicrobianos.

A análise das imagens por microscopia confocal, de modo geral, revelaram uma menor formação de biofilme em fragmentos impregnados quando comparados aos controles não impregnados, evidenciando o que já foi descrito anteriormente. Além disso, podemos visualizar também uma menor viabilidade celular em biofilmes formados nos fragmentos impregnados (KL1S e PRAT) (**Figura 11**).

Ademais, a análise da microscopia confocal demonstrou que a impregnação CPZ reduziu significativamente ($P < 0,05$) a espessura máxima, biomassa e espessura média da biomassa de biofilmes maduros, e induziu um aumento significativo ($P < 0,05$) no coeficiente de rugosidade do biofilme (**Gráfico 15**), quando comparado ao fragmento de cateter não impregnado. Estes resultados juntos demonstram que a impregnação CPZ dificulta o crescimento de biofilmes robustos em cateteres urinários.

Gráfico 15 – Análise da microscopia confocal de biofilmes maduros de *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* e *Proteus mirabilis* crescidos em cateteres impregnados com clorpromazina (CPZ). Controle de crescimento: fragmento de cateter não impregnado. Dados expressos como média e desvio padrão dos valores obtidos para os seguintes parâmetros: espessura máxima, biomassa, espessura média da biomassa, coeficiente de rugosidade (adimensional) e relação superfície: volume. *indica diferenças estatisticamente significativas entre cateteres impregnados com CPZ e controle não impregnado ($P < 0,05$).

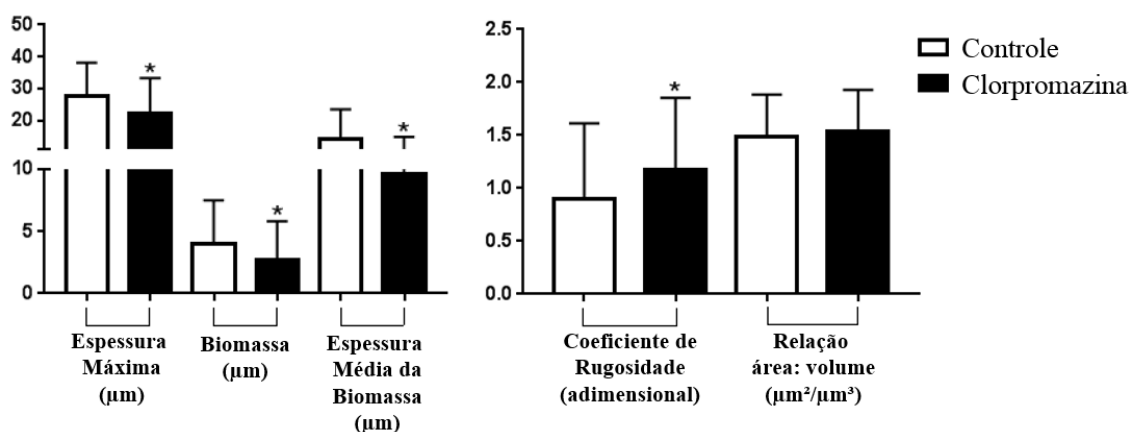
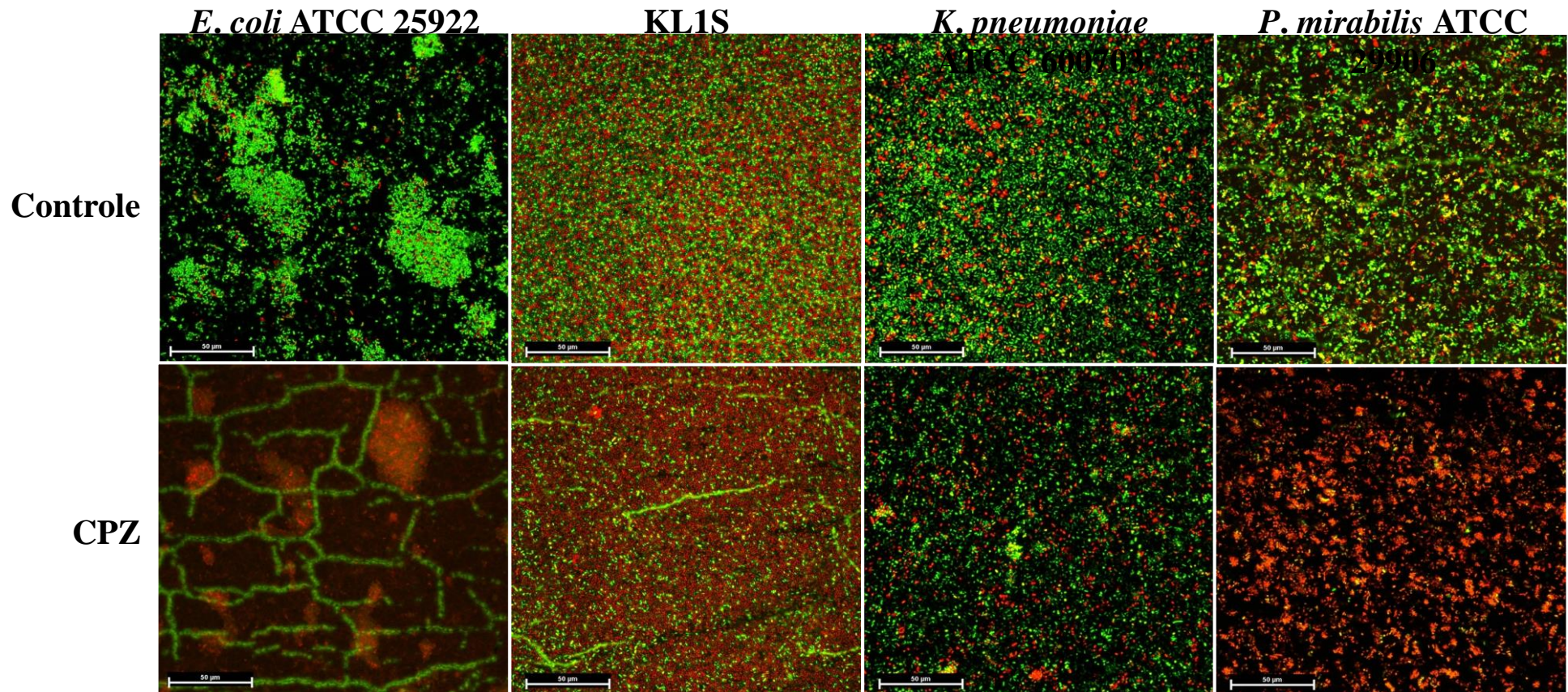


Figura 11 – Biofilmes maduros de *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* e *Proteus mirabilis* crescidos em fragmentos de cateteres impregnados com clorpromazina (CPZ). Observar a redução global na quantidade de células vivas (pontos verdes) aderidas ao cateter impregnado com CPZ, quando comparado com o controle de crescimento não impregnado. Para *E. coli* ATCC 25922, não foram observadas células vivas na superfície do cateter impregnado com CPZ. KL1S: isolado clínico sensível a antimicrobianos de *K. pneumoniae* da urina. Ampliação de 600X, escala de 50 µm, imagens geradas com laser de 488 nm (SYTO9). Pontos vermelhos indicam células inviáveis ou mortas.



7. DISCUSSÃO

Devido ao aumento da resistência bacteriana aos agentes antimicrobianos, estratégias estão sendo desenvolvidas para combater infecções e minimizar as pressões seletivas que levam ao surgimento de resistência antimicrobiana (JORGE; LOURENÇO; PEREIRA, 2012; ALTERIIS *et al.*, 2018). A expressão da bomba de efluxo e a formação de biofilme, ambas coordenadas por *quorum sensing*, estão diretamente associadas ao desenvolvimento de resistência a antimicrobianos de uso clínico. Além disso, a formação de biofilme em cateteres vesicais de demora é a principal causa de ITU relacionada à IRAS (KART *et al.*, 2017).

Nesse contexto, o redirecionamento de fármacos e a utilização de compostos naturais têm se mostrado eficazes estratégias para superar os mecanismos de resistência aos antimicrobianos, considerando que esses compostos redirecionados podem atuar em moléculas diferentes daquelas moléculas alvo dos antibióticos clássicos. A CPZ, por exemplo, é um agente antipsicótico fenotiazínico que também apresenta propriedades antimicrobianas, possivelmente por inibir as bombas de efluxo e alterar a permeabilidade da membrana celular. Sabe-se que a CPZ, em concentrações sub-inibitórias, inibe as bombas de efluxo, sem causar morte bacteriana. Essas bombas de efluxo são comumente superexpressas quando os microrganismos estão na forma de biofilme, e são responsáveis pela expulsão de compostos tóxicos para o meio extracelular, atuando como importantes mecanismos de defesa dos biofilmes. Assim, inibir a atividade dessas bombas parece ser uma estratégia plausível para controlar o crescimento do biofilme (SIDRIM *et al.*, 2017; DASTIDAR *et al.*, 2013; AMARAL; LORIAN, 1991; SUN; DENG; YAN, 2014).

Além disso, o sistema de comunicação *quorum sensing* depende da expressão e funcionamento das bombas de efluxo, pois elas participam ativamente da extrusão das AIs responsáveis por sinalizar as ações coordenadas por esse sistema. Assim, compostos que atuam no *quorum sensing*, como a curcumina e o furaneol, ou na inibição de bombas de efluxo, podem interferir na formação de biofilmes (SUBHADRA *et al.*, 2018; SIDRIM *et al.*, 2017).

Em nosso estudo, as CIMs de CPZ apresentaram variação intraespecífica e interespecífica, variando de 39,06 a 625 µg/mL. Isso pode estar associado à inclusão de isolados clínicos com perfil de sensibilidade antimicrobiana variado, como mostrado pelas amplas CIMs obtidas para CIP (0,008 - 32 µg/mL) e MER (0,06 - >16 µg/mL). Resultados semelhantes foram demonstrados por estudos anteriores. Dastidar *et al.* (2013), por exemplo,

descreveram variadas CIMs de CPZ contra bactérias Gram negativas, variando de 25 - 100 µg/mL, que foram um pouco inferiores às encontradas no presente estudo. Em outro estudo, os autores demonstraram que o CPZ a 60 µg/mL inibiu completamente o crescimento da *E. coli* ATCC 25922, o que está de acordo com os resultados obtidos na presente pesquisa (AMARAL; LORIAN, 1991). Já a CUR e o FUR, não apresentaram CIMs para nenhum dos isolados testados, não mostrando uma coerência com estudos já publicados. Em um estudo de Mahady *et al.* (2002), a CUR foi capaz de inibir o crescimento de isolados de *Helicobacter pylori* em uma concentração que variava entre 6,25 a 50 µg/mL. Já o FUR apresentou CIMs que variaram entre 40 a 120 µg/mL, sendo que nesse estudo com FUR, foram incluídas bactérias Gram positivas e Gram negativas, como *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus* sp. e *Escherichia coli*, com diferentes perfis de sensibilidade, semelhante ao nosso estudo (SUNG *et al.*, 2007).

Quanto aos efeitos da CPZ em biofilmes maduros, os valores obtidos contra os isolados testados foram mais homogêneos que os valores de CIM de CPZ, mas os CEMBs foram significativamente maiores que os de CIMs. Os CEMBs foram, pelo menos, duas vezes maiores que as CIMs, como observado contra algumas cepas de *P. mirabilis*, e até 15 vezes mais alto contra os outros isolados avaliados. Diversas pesquisas mostraram que essa diminuição na sensibilidade a fármacos está associada a diversos fatores, como a estrutura do biofilme em si, a presença da matriz extracelular do biofilme, que protege as células microbianas imersas nele e as diferenças na expressão gênica, levando a diferenças fenotípicas entre os genes das células planctônicas e sésseis (OLSON *et al.*, 2002). Neste contexto, sabe-se que os biofilmes são até 1.000 vezes menos sensíveis a agentes antimicrobianos do que suas formas planctônicas (OLSON *et al.*, 2002; CASTANEDA *et al.*, 2016). Além disso, a resistência antimicrobiana do biofilme também está associada à maior atividade de efluxo, levando ao aumento da extrusão do meio intracelular, o que diminui a eficácia dos antimicrobianos (SINGH *et al.*, 2017). É importante enfatizar que as bombas de efluxo também desempenham papéis fisiológicos importantes, como a proteção de células microbianas de compostos tóxicos dentro da estrutura do biofilme e a liberação de moléculas autoindutoras envolvidas no *quorum sensing* (SUN; DENG; YAN, 2014).

Já para a ação da CPZ na formação de biofilmes, ela não só inibiu o crescimento *in vitro* de todas as espécies testadas, como também, em concentrações subinibitórias, reduziu a biomassa de biofilmes, corroborando os relatos anteriores sobre os inibidores da bomba de efluxo e destacando o papel essencial das bombas de efluxo para o desenvolvimento de

biofilmes (KVIST; HANCOCK; KLEMM, 2008; SINGH *et al.*, 2017). Considerando que as CAUTIs são uma das mais prevalentes das IRAS e que a formação de biofilme nos cateteres vesicais dificulta o sucesso do tratamento dessas infecções, levando a grandes perdas econômicas (KART *et al.*, 2017). Assim, o efeito da CPZ no crescimento de biofilmes é de extrema importância para esta pesquisa, pois o objetivo de impregnação de cateteres vesicais, é controlar a formação de biofilme por uropatógenos.

Paralelamente, para a CUR, houve uma redução significativa somente na maior concentração utilizada (512 μM), corroborando estudos anteriores que demonstraram que a utilização de lipossomas de CUR inibiu a formação de biofilmes, produção de sideróforos e de outros fatores de virulência inibindo o *quorum sensing* (DING *et al.*, 2017). Porém, o FUR não apresentou a ação esperada, com resultados contrastantes com estudos prévios que observaram a redução de biofilmes (CHOI *et al.*, 2014).

Além disso, foi realizado um ensaio de toxicidade, utilizando células MRC-5, demonstrando que a CPZ e a CUR não eram citotóxicos, no intervalo de concentração testado (32 – 2.048 $\mu\text{g/mL}$ e 8 – 512 μM , respectivamente), mas que o FUR apresentou citotoxicidade nas concentrações testadas acima de 61.82 μM . Assim, após a obtenção desses resultados *in vitro*, decidimos investigar a aplicabilidade da impregnação por cateter.

Nesta pesquisa, o protocolo de impregnação de cateter descrito por Fisher *et al.* (2015) foi utilizado com algumas modificações. A impregnação ocorreu com sucesso, conforme demonstrado pela análise do EDS, que demonstrou uma grande quantidade de átomos de carbono aderidos à superfície dos fragmentos do cateter. Esta metodologia MEV-EDS foi usada anteriormente, demonstrando a impregnação bem sucedida de cateter com nitrato de prata (WANG *et al.*, 2015). Porém, diferente do estudo do Fisher *et al.* (2015) e do Wang *et al.* (2015), a impregnação também pôde ser comprovada, pelo menos para um dos compostos utilizados, graças a sua cor característica. A CUR possui uma cor alaranjada forte que após a impregnação, mudou a cor original dos fragmentos impregnados com ela, deixando eles corados de laranja. Isso serviu como mais uma comprovação de que o método foi realmente eficaz. Outra constatação que nosso estudo demonstrou foi que, a impregnação com a CUR e o FUR, modificou de forma abrupta a superfície dos fragmentos e que a impregnação com a CPZ demonstrou o contrário, não alterando drasticamente a superfície do material.

Em seguida, foram utilizados cateteres impregnados para avaliar a formação de biofilme. Os fragmentos impregnados com CUR e FUR, demonstraram um comportamento oposto ao esperado, promovendo uma maior formação de biofilmes nos fragmentos

impregnados. Podemos supor que esse comportamento pode ser explicado pela alteração na superfície dos fragmentos, auxiliando uma maior adesão dos micro-organismos, visto que estudos anteriores usando essa técnica não deformaram a superfície do material impregnado e obtiveram ótimos resultados na inibição da formação de biofilmes (FISHER *et al.*, 2015). Porém, mais estudos necessitam ser realizados para comprovar tal sugestão.

Os fragmentos de cateter vesical impregnados com CPZ demonstraram que essa abordagem reduziu significativamente a aderência bacteriana aos dispositivos, chegando a 100% de inibição, levando a uma diminuição significativa da biomassa e da espessura dos biofilmes, como demonstrado no ensaio biológico e nas imagens obtidas por microscopia confocal. Além disso, a impregnação com CPZ também aumentou o coeficiente de rugosidade dos biofilmes, demonstrando que essas estruturas bacterianas são menos homogêneas e robustas em cateteres impregnados (SIDRIM *et al.*, 2017). Curiosamente, não apenas a impregnação com CPZ reduziu a adesão bacteriana aos cateteres, mas também reduziu o crescimento do biofilme em placas de poliestireno onde os ensaios foram conduzidos (dados não mostrados), demonstrando que o CPZ também é liberado dos cateteres, exercendo sua atividade antimicrobiana. Outros estudos avaliando os efeitos da impregnação de cateteres com antimicrobianos, agentes antissépticos ou ambos também mostraram resultados promissores (FISHER *et al.*, 2015; KVIST; HANCOCK; KLEMM, 2008). No entanto, tem sido discutido que a exposição contínua a agentes antimicrobianos exerce uma pressão seletiva sobre as comunidades microbianas, levando ao surgimento de resistência antimicrobiana (PLACHOURAS *et al.*, 2018). Em contraste, o CPZ não é um fármaco antimicrobiano e não atua sobre moléculas alvo de agentes antibacterianos clássicos, podendo, portanto, não contribuir para o surgimento de resistência antibacteriana.

Estudos anteriores relatam que os inibidores da bomba de efluxo não apenas apresentam atividade antibiofilme, mas também interagem sinergicamente com agentes antimicrobianos, aumentando a sensibilidade microbiana a fármacos e, potencialmente, auxiliando no tratamento de infecções (COUTINHO *et al.*, 2010; SIDRIM *et al.*, 2017). A CIP e MER foram incluídos no presente estudo para avaliar seu efeito nos biofilmes cultivados em cateteres impregnados com CPZ, por serem os principais fármacos utilizados no tratamento da ITU e um dos mais utilizados em unidades de terapia intensiva, respectivamente. Tanto CIP quanto MER isolaram significativamente biofilmes maduros em cateteres não impregnados, mas a CIP foi estatisticamente menos efetiva que a impregnação de MER e CPZ. Quanto à combinação de CIP ou MER com CPZ, os cateteres impregnados

aumentaram significativamente a atividade antibiofilme de ambos os antimicrobianos. Considerando que a inibição da bomba de efluxo prejudica a formação do biofilme e perturba os biofilmes maduros (SUN; DENG; YAN, 2014; SIDRIM *et al.*, 2017), a impregnação com CPZ potencializa a atividade antibiofilme da CIP e MER, possivelmente porque altera a estrutura do biofilme, tornando-a mais permeável aos fármacos, evidenciada pelos achados da análise CLSM. Além disso, a inibição do efluxo aumenta a sensibilidade microbiana a certas drogas, especialmente aquelas que são substratos para bombas de efluxo, pois permite que haja uma maior concentração do fármaco no interior da célula microbiana (MUSUMECI *et al.*, 2003).

Assim, a demanda por novas estratégias terapêuticas apoia a aplicação do redirecionamento de fármacos para combater infecções relacionadas ao biofilme. Nesse contexto, o uso de inibidores da bomba de efluxo aumenta a suscetibilidade do biofilme aos antimicrobianos, aumentando, assim, sua eficácia (SIDRIM *et al.*, 2017).

8. CONCLUSÕES

A partir desse estudo, foi possível evidenciar que:

Com o intuito de promover uma maior formação de biofilmes, a padronização do meio de cultura, da concentração e tempo de preparo do inóculo e do tempo de formação do biofilme, possibilita formar biofilmes mais robustos para os ensaios utilizando os compostos e os fragmentos de cateter.

Este estudo demonstra que a curcumina e a clorpromazina são capazes de inibir a formação de biofilmes e desestruturam biofilmes maduros de *E. coli*, *P. mirabilis* e *K. pneumoniae*;

Concluimos também que, a clorpromazina, impregnada em cateteres vesicais de demora, é capaz de reduzir a formação de biofilme por Enterobacteriaceae associada a infecção do trato urinário e potencializam a atividade antibiofilme de CIP e MER.

Esses achados trazem perspectivas para o uso da clorpromazina como adjuvante na prevenção e tratamento de infecção do trato urinário associado a cateter.

REFERÊNCIAS

- 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.
- ALI, L.; GORAYA, M.U.; ARAFAT, Y.; AJMAL, M.; CHEN, J.L.; YU, D. Molecular Mechanism of Quorum-Sensing in *Enterococcus faecalis*: Its Role in Virulence and Therapeutic Approaches. **Int J Mol Sci**, v. 18, n. 5, p. 960, 2017.
- AL-BADR, A.; AL-SHAIKH, G. Recurrent Urinary Tract Infections Management in Women: A review. **Sultan Qaboos Univ Med J**, v. 13, n. 3, p. 359-367, 2013.
- ALTERIIS, E.; LOMBARDI, L.; FALANGA, A.; NAPOLANO, M.; GALDIERO, S.; SICILIANO, A.; CAROTENUTO, R.; GUIDA, M.; GALDIERO, E. Polymicrobial antibiofilm activity of the membranotropic peptide gH625 and its analogue. **Microb Pathog**, v. 125, p. 189-195, 2018.
- AMARAL, L.; LORIAN, V. Effects of chlorpromazine on the cell envelope proteins of *Escherichia coli*. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 35, n. 9, p. 1923-1924, 1991.
- ANDERSEN, J.L.; HE, G.X.; KAKARLA, P.; K C,R.; KUMAR, S.; LAKRA, W.S.; et al. Multidrug efflux pumps from Enterobacteriaceae, *Vibrio cholerae* and *Staphylococcus aureus* bacterial food pathogens. *Int J Environ Res Public Health*, v. 12, n. 2, p. 1487-1547, 2015.
- ARMBRUSTER, C.E.; MOBLEY, H.L.T. Merging mythology and morphology: the multifaceted lifestyle of *Proteus mirabilis*. **Nat rev Microbiol**, v. 10, n. 11, p. 743-754, 2012.
- ARMBRUSTER, C.E.; MOBLEY, H.L.T; PEARSON, M.M. Pathogenesis of *Proteus mirabilis* Infection. **EcoSal Plus**, v. 8, n. 1, p. 10.1128, 2018.
- BAGLEY, S.T. Habitat association of *Klebsiella* species. **Infect Control**, v. 6, p. 52-58, 1985.
- BANDARA, H.M.H.N.; MATSUBARA, V.H.; SAMARANAYAKE, L.P. Futuretherapies targeted towards eliminating *Candida* biofilms and associated infections. **Expert RevAnti infect Ther**, 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.
- BLOUNT, Z.D. The unexhausted potential of *E. coli*. **eLife**, v. 4, p. e05826, 2015.
- BOLL, E.J.; STRUVE, C.; BOISEN, N.; OLESEN, B.; STAHLHUT, S.G.; KROGFELT, K.A. Role of enteroaggregative *Escherichia coli* virulence factors in uropathogenesis. **Infect Immun**, v. 81, n. 4, p. 1164-1171, 2013.

BUSH, K. Top 10 Beta-lactamase Papers for 2015. Presented at: **ASM Microbe 2016**. Boston, MA, 2016.

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

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

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, p. 105-119, 2014.

CHENOWETH, C.E.; SAINT, S. Urinary tract infections. **Infect Dis Clin North Am**, v.25, p. 103-15, 2011.

CHOI, S.C.; ZHANG, C.; MOON, S.; OH, Y.S. Inhibitory effects of 4-hydroxy-2,5-dimethyl-3(2H)-furanone (HDMF) on acyl-homoserine lactone-mediated virulence factor production and biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. **J Microbiol**, v. 52, n. 9, p. 734-742, 2014.

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

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

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

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

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

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

CROXEN, M.A.; LAW, R.J.; SCHOLZ, R.; KEENEY, K.M.; WLODARSKA, M.; FINLAY, B.B. Recent Advances in Understanding Enteric Pathogenic *Escherichia coli*. **Clin Microbiol Rev**, v. 26, n. 4, p. 822-880, 2013.

DASTIDAR, S.G.; KRISTIENSEN, J.E.; MOLNAR, J.; AMARAL, L. Role of Phenothiazines and Structurally Similar Compounds of Plant Origin in the Fight against Infections by Drug Resistant Bacteria. **Antibiotics**, v. 2, n. 1, p. 58-72, 2013.

DAVIES, D.G.; GEESEY, G.G. Regulation of the alginate biosynthesis gene *algC* in *Pseudomonas aeruginosa* during biofilm development in continuous culture. **Appl Environ Microbiol**, v. 61, n. 3, p. 860-867, 1995.

DELCARU, C.; ALEXANDRU, I.; PODGOREANU, P.; GROSU, M.; STAVROPOULOS, E.; CHIFIRIUC, M.C.; LAZAR, V. Microbial Biofilms in Urinary Tract Infections and Prostatitis: Etiology, Pathogenicity, and Combating strategies. **Pathogens**, v. 5, n. 4, p. 65, 2016.

DING, T.; LI, T.; WANG, Z.; LI, J. Curcumin liposomes interfere with *quorum sensing* system of *Aeromonas sobria* and *in silico* analysis. **Scientific Reports**, v. 7, p. 8612, 2017.

DONLAN, R.M. Biofilms: Microbial Life on Surfaces. **Emerg Infect Dis**, v. 8, n. 9, p. 881-890, 2002.

DONLAN, R.M.; COSTERTON, J.W. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. **Clin Microbiol Rev**, v. 15, n. 2, p. 167-193, 2002.

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

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

FLEMMING, H.; WINGENDER, J. The biofilm matrix. **Nat Rev Microbiol**, v. 8, p. 623-633, 2010.

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

FOXMAN, B. The epidemiology of urinary tract infection. **Nat Rev Urol**, v. 7, n. 12, p. 653-660, 2010.

FOXMAN, B. Urinary tract infection syndromes: occurrence, recurrence, bacteriology, risk factors, and disease burden. **Infect Dis Clin North Am**, v. 28, p. 1-13, 2014.

FRIEDLANDER, C. Uber die scizomyceten bei der acuten fibrosen pneumonie. **Arch Pathol Anat Physiol Klin Med**, v. 87, p. 319-324, 1882.

FURNISS, R.C.D.; CLEMENTS, A. Regulation of the Locus of Enterocyte Effacement in Attaching and Effacing Pathogens. **Margolin W, ed. J Bacteriol**, v. 200, n. 2, p. e00336-17, 2018.

GONÇALVES, M.S.; DELATTRE, C.; BALESTRINO, D.; CHARBONNEL, N.; ELBOUTACHFAITI, R.; WADOUACHI, A.; BADEL, S.; BERNARDI, T.; MICHAUD, P.; FORESTIER, C. Anti-Biofilm Activity: A Function of *Klebsiella pneumoniae* Capsular Polysaccharide. **PLoS ONE**, v. 9, n. 6, p. e99995. Disponível em: doi:10.1371/journal.pone.0099995.

GUILIAN, L.; JINGRUI ZHANG, C.L.; QIAN, G.; YI J.; JIANHAO, W.; YAN, Q.; XIUQIN, Z.; LI-LI, Z.; JIANXIN, L.; KANGLIN, W. Antimycobacterial activity of five efflux pump inhibitors against *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates. **J Antibiot**, v. 69, p. 173-175, 2016.

GULATI, M.; NOBILE, C. J. *Candida albicans* biofilms: development, regulation, and molecular mechanisms. **Microb Infect**, v. 18, n. 5, p. 310-321, 2016.

GUPTA, S.C.; PATCHVA, S.; AGGARWAL, B.B. Therapeutic Roles of Curcumin: Lessons Learned from Clinical Trials. **The AAPS Journal**, v. 15, n. 1, p. 195-218, 2013.

HEYDORN, A. Quantification of biofilm structures by the novel computer program COMSTAT. **Microbiol**, v. 10, n. 14, p. 2395-2407, 2000.

HEWLINGS, S.J.; KALMAN, D.S. "Curcumin: A Review of Its' Effects on Human Health." **Foods**, v. 6, n. 10, p. 92, 2017.

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

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

JACOBSEN, S.M.; STICKLER, D.J.; MOBLEY, H.L.T.; SHIRTLIFF, M.E. Complicated Catheter-Associated Urinary Tract Infections Due to *Escherichia coli* and *Proteus mirabilis*. **Clin Microbiol Rev**, v. 21, n. 1, p. 26-59, 2008.

JAMAL, M.; AHMAD, W.; ANDLEEB, S.; JALIL, F.; IMRAN, M.; NAWAZ, M.A.; HUSSAIN, T.; ALI, M.; RAFIQ, M.; KAMIL, M.A. Bacterial biofilm and associated infections. **J Chin Med Assoc**, v. 81, n. 1, p. 7-11, 2018.

JANDA, J.M.; ABBOTT, S.L.; MCIVER, C.J. *Plesiomonas shigelloides* revisited. **Clin Microbiol Ver**, v. 29, p. 349-374, 2016.

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

JOHNSON, J.R.; RUSSO, T.A. Acute Pyelonephritis in Adults. **N Engl J Med**, v. 378 n. 1 p. 48-59, 2018.

JONES, B.V.; MAHENTHIRALINGAM, E.; SABBUBA, N.A.; STICKLER, D.J. Papel da enxameação na formação de biofilmes cristalinos de *Proteus mirabilis* em cateteres urinários. **J Med Microbiol**, v. 54, p. 807-813, 2005.

JORGE, A.P.; LOURENÇO, M.O.P. New trends in peptide-based anti-biofilm strategies: a review of recent achievements and bioinformatic approaches. **Biofoul**, v. 28, n. 10, p. 1033-1061, 2012.

KART, D.; KUSTIMUR, A.S.; SAĞIROĞLU, M.; KALKANCI, A. Evaluation of Antimicrobial Durability and Anti-Biofilm Effects in Urinary Catheters Against Enterococcus faecalis Clinical Isolates and Reference Strains. **Balkan Med J**, v. 34, n. 6, p.546-552, 2017.

KLIN, K.A.; SCHWARTZ, D.J.; LEWIS, W.G.; HULTGREN, S.J.; LEWIS, A.L. Immune activation and suppression by group B *Streptococcus* in a murine model of urinary tract infection. **Infect Immun**, v. 79, p. 3588-3595, set.2011.

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

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

KVIST, M; HANCOCK, V; KLEMM, P. Inactivation of efflux pumps abolishes bacterial biofilm formation. **Appl Environ Microbiol**, v. 74, n. 1, p. 7376-7382, 2008.

LASARRE, B.; FEDERLE, M.J. Exploiting *quorum sensing* to confuse bacterial pathogens. **Microbiol Molecul Biol Rev**, v. 77, p. 73-111, 2013.

LEE, C.R.; LEE, J.H.; PARK, K.S.; JEON, J.H.; KIM, Y.B.; CHA, C.J.; JEONG, B.C.; LEE, S.H. Antimicrobial resistance of hypervirulent *Klebsiella pneumoniae*: epidemiology, hypervirulence-associated determinants, and resistance mechanisms. **Front cell infect microbiol**, v. 7, p. 483, 2017.

LEWIS, K. Multidrug tolerance of biofilms and persister cells. **Curr Top Microbiol Immunol**, v. 322, p. 107-131, 2008.

LI, X.H.; LEE, J.H. Antibiofilm agents: A new perspective for antimicrobial strategy. **J Microbiol**, v. 55, p. 753, 2017.

LIU, D. Diarrhoeagenic *Escherichia coli*. **Molecular Medical Microbiology**, v. 2, n. 2, p. 1133-1146, 2015.

LO, J.; LANGE, D.; CHEW, B. Ureteral Stents and Foley Catheters-Associated Urinary Tract Infections: The Role of Coatings and Materials in Infection Prevention. **Antibiotics**, v. 3, n. 1, p. 87-97, 2014.

MAHADY, G.B.; PENDLAND, S.L.; YUN, G.; LU, Z.Z. Turmeric (*Curcuma longa*) and curcumin inhibit the growth of *Helicobacter pylori*, a group 1 carcinogen. **Anticancer Res**, v. 22, p. 4179-4181, 2002.

MARSHALL, K.C. Interfaces in microbial ecology. **Harvard University Press**, p. 44-47, 1976.

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

MAURA, D.; BALLOK, A.E.; RAHME, L.G. Considerations and caveats in anti-virulence drug development. **Current opinion microbiol**, v. 33, p. 41-46, 2016.

MUNOZ-PRICE, L.S.; POIREL, L.; BONOMO, R.A.; SCHWABER, M.J.; DAIKOS, G.L.; CORMICAN, M.; CORNAGLIA, G.; GARAU, J.; GNIADKOWSKI, M.; HAYDEN, M.K.; KUMARASAMY, K.; LIVERMORE, D.M.; MAYA, J.J.; NORDMANN, P.; PATEL, J.B.; PATERSON, D.L.; PITOUT, J.; VILLEGAS, M.V.; WANG, H.; WOODFORD, N.; QUINN, J.P. Clinical epidemiology of the global expansion of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemases. **The Lancet Infect dis**, v. 13, n. 9, p. 785-796, 2013.

MUSUMECI, R; SPECIALE, A; COSTANZO, R; ANNINO, A; RAGUSA, S; RAPISARDA, A; et al. Berberis aetnensis C. Presl. extracts: antimicrobial properties and interaction with ciprofloxacin. **Int J Antimicrob Agents**, v. 22, n. 1 p. 48-53, 2003.

NEIDELL, M.J.; COHEN, B.; FURUYA, Y.; HILL, J.; JEON, C.Y.; GLIED, S.; LARSON, E.L. Costs of Healthcare- and Community-Associated Infections With Antimicrobial-Resistant Versus Antimicrobial-Susceptible Organisms. **Clin infect dis**, v. 55, n. 6, p. 807-815, 2012.

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

NOBILE, C.J.; JOHNSON, A.D. Biofilmes de *Candida albicans* e doença humana. **Annu Rev Microbiol**, v. 69, p. 71-92, 2015.

NORSWORTHY, A.N.; PEARSON, M.M. From Catheter to Kidney Stone: The Uropathogenic Lifestyle of *Proteus mirabilis*. **Trends in microbiol**, v. 25, p. 4, p. 304-315, 2017.

OLSON, M.E; CERI, H.; MORCK, D.W.; BURET, A.G.; LEIA, R.R. Biofilm bacteria: formation and comparative susceptibility to antibiotics. **Can J Vet Res**, v. 66, n. 1, p. 86-92, 2002.

OVERHAGE, J.; CAMPISANO, A.; BAINS, M.; TORFS, E.C.W.; REHM, B.H.A.; HANCOCK, R.E.W. Human Host Defense Peptide LL-37 Prevents Bacterial Biofilm Formation. **Infect Immun**, v. 76, n. 9, p. 4176-4182, 2008.

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. 534-546, 2000.

PLACHOURAS, D.; KÄRKI, T.; HANSEN, S.; HOPKINS, S.; LYYTIKÄINEN, O.; MORO, M.L.; et al. The point prevalence survey study group. antimicrobial use in european acute care hospitals: results from the second point prevalence survey (PPS) of healthcare-associated infections and antimicrobial use, 2016 to 2017. **Euro Surveill**, v. 23, n. 46, 2018.

PEREIRA, U.A.; BARBOSA, L.C.; MALTHA, C.R.; DEMUNER, A.J.; MASOOD, M.A.; PIMENTA, A.L. Inhibition of *Enterococcus faecalis* biofilm formation by highly active lactones and lactams analogues of rubrolides. **Eur J MedChem**, v. 82, p. 127-138, 2014.

PICKARD, R.; LAM, T., MACLENNAN, G., STARR, K.; KILONZO, M.; MCPHERSON, G.; GILLIES, K.; MCDONALD, A.; WALTON, K.; BUCKLEY, B.; GLAZENER, C.; BOACHIE, C.; BURR, J.; NORRIE, J.; VALE, L.; GRANT, A.; N'DOW, J. Antimicrobial catheters for reduction of symptomatic urinary tract infection in adults requiring short-term catheterisation in hospital: a multicentre randomised controlled trial. **Lancet**, ed. 1, v. 380, n. 9857, p. 1927-1935, 2012.

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

RAJENDRAN, R.; SHERRY, L.; NILE, C. J.; SHERRIFF, A.; JOHNSON, E. M. HANSON, M. F. WILLIAMS, C.; MUNRO, C. A.; JONES, B. J.; RAMAG, G. Biofilm formation is a risk factor for mortality in patients with *Candida albicans* bloodstream infection-Scotland, 2012–2013. **Clin Microbiol Infect**, v. 22, p. 87–93, 2016;

REDDY, R.C.; VATSALA, P.G.; KESHAMOUNI, V.G.; PADMANABAN, G.; RANGARAJAN, P.N. Curcumin for malaria therapy. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 326, n. 2, p. 472-474, 2015.

ROILIDES, E.; SIMITSOPOULOU, M.; KATRAGKOU, A.; WALSH, T.J. How biofilms evade host defenses. **Microbiol Spect**, v.3, n. 3, 2015.

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

ROSHNIAMALARADJOU, M.A.; VENKITANARAYANAN, K. Role of Bacterial Biofilms in Catheter-Associated Urinary Tract Infections (CAUTI) and Strategies for Their Control.

INTECH, p. 2-14, jul, 2013. Disponível em: <https://www.intechopen.com/books/recent-advances-in-the-field-of-urinary-tract-infections/role-of-bacterial-biofilms-in-catheter-associated-urinary-tract-infections-cauti-and-strategies-for->. Acesso em: 14 set, 2018.

ROY, R.; TIWARI, M.; DONELLI, G.; TIWARI, V. Strategies for combating bacterial biofilms: a focus on anti-biofilm agents and their mechanisms of action. **Virulence**, v. 9, p. 522-554, 2017.

RUTHERFORD, S.T.; BASSLER, B.L. Bacterial quorum sensing: its role in virulence and possibilities for its control. **Cold Spring Harb Perspect Med**, v. 2, a012427, 2012.

SCHAFFER, J.N.; PEARSON, M.M. *Proteus mirabilis* and urinary tract infections. **microbiol spect**, v. 3, n. 5, p. 10.1128/microbiolspec.UTI-0017-2013, 2015.

SCHAFFER, J.N.; NORSWORTHY, A.N.; SUN, T.T.; PEARSON, M.M. *Proteus mirabilis* fimbriae- and urease-dependent clusters assemble in an extracellular niche to initiate bladder stone formation. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 113, n. 16, p. 4494-4499, 2016.

SCHWAB W. 4-hidroxi-2,5-dimetil-3 (2H) -furanona natural (Furaneol®). **Moléculas**, v. 18, n. 6, p. 6936-6951, 2013.

SHON, A.S.; BAJWA, R.P.S.; RUSSO, T.A. Hypervirulent (hypermucoviscous) *Klebsiella pneumoniae*: A new and dangerous breed. **Virulence**, v. 4, n. 2, p. 107-118, 2013.

SHULMAN, S.T.; FRIEDMANN, H.C.; SIMS, R.H. Theodor Escherich: the first pediatric infectious diseases physician? **Clin Infect Dis**, v. 45, p. 1025-1029, 2007.

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

SINGHA, P.; LOCKLIN, J.; HANDA, H. A Review of the Recent Advances in Antimicrobial Coatings for Urinary Catheters. **Acta biomaterial**, v. 50, p. 20-40, 2017.

SINGH, V.K.; MISHRA, A.; JHA, B. Anti-quorum sensing and anti-biofilm activity of *delftia tsuruhatensis* extract by attenuating the *quorum sensing*-controlled virulence factor production in *Pseudomonas aeruginosa*. **Front Cell Infect Microbiol**, v. 7, p. 337, 2017.

SOUSA, Á.F.L.; QUEIROZ, A.A.F.L.N.; OLIVEIRA, L.B.; VALLE, A.R.M.C.; MOURA, M.E.B. Representações sociais da infecção comunitária por profissionais da atenção primária. **Acta paul enferm**, v. 28, n. 5, p. 454-459, 2015.

SOUSA, M.A.S.; NASCIMENTO, G.C.; BIM, F.L.; OLIVEIRA, L.B.; OLIVEIRA, A.D.S. Infecções hospitalares relacionadas a procedimentos invasivos em unidades de terapia intensiva: revisão integrativa. **Rev Pre Infec e Saúde**, v. 3, n. 3, p. 49-58, 2017.

- SUBHADRA, B.; KIM, D.H.; WOO, K.; SURENDRAN, S.; CHOI, C.H. Control of Biofilm Formation in Healthcare: Recent Advances Exploiting Quorum-Sensing Interference Strategies and Multidrug Efflux Pump Inhibitors. **Materials (Basel)**, v. 11, n. 9, p. 1676, 2018.
- SUNG, W.S.; JUNG, H.J.; PARK, K.; KIM, H.S.; LEE, I.S.; LEE, D.G. 2,5-dimethyl-4-hydroxy-3(2H)-furanone (DMHF); antimicrobial compound with cell cycle arrest in nosocomial pathogens. **Life Sci**, v. 80, n. 6, p. 586-591, 2007.
- SYBIYA, I.A.; PACKIAVATHY, V.; SASIKUMAR, P.; PANDIAN, S.K.; RAVI, A.V. Prevention of *quorum-sensing*-mediated biofilm development and virulence factors production in *Vibrio* spp. by curcumin. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 97, p. 10177-10187, 2013.
- STARKEY, M.; LEPINE, F.; MAURA, D.; BANDYOPADHAYA, A.; LESIC, B.; HE, J.; KITAO, T.; RIGHI, V.; MILOT, S.; TZIKA, A.; RAHME, L. Identification of Anti-virulence Compounds That Disrupt *Quorum-Sensing* Regulated Acute and Persistent Pathogenicity. Whiteley M, ed. **PLoS Pathogens**, v. 10, n. 8, p. e1004321, 2014.
- STEPANOVIC, S.; IRKOVIC, I.C.; RANIN, L.; SVABIC´-VLAHOVIC, M. Biofilm formation by *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes* on plastic surface. **Lett Appl Microbiol**, v. 38, p. 428-432, 2004.
- STEPANOVIĆ, S.; VUKOVIĆ, D.; HOLA, V.; DI BONAVENTURA, G.; DJUKIĆ, S.; CIRKOVIĆ, I.; RUZICKA, F. Quantification of biofilm in microtiter plates: overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by *Staphylococci*. **APMIS**, v. 115, n. 8, p. 891-899, 2007.
- TANSARLI, G.S.; ATHANASIOU, S.; FALAGAS, M.E. Evaluation of Antimicrobial Susceptibility of Enterobacteriaceae Causing Urinary Tract Infections in Africa. **Antimicrob Agent Chemoth**, v. 57, n. 8, p. 3628-3639, 2013.
- TENKE, P.; KOVACS, B.; JOHANSEN, T.E.; MATSUMOTO, T.P.A.; NABER, K.G. Orientações europeias e asiáticas sobre a gestão e prevenção de infecções do trato urinário associadas a cateteres. **Int J Antimicrob Agents**, v. 31, n. 1, p. 68-78, 2008.
- TEOW, S.Y.; LIEW, K.; ALI, S.A.; KHOO, A.S.B.; PEH, S.C. Antibacterial Action of Curcumin against *Staphylococcus aureus*: A Brief Review. **J Tropic Med**, e:2853045, nov 2016. Disponível em: <<https://www.hindawi.com/journals/jtm/2016/2853045/>>.
- TERLIZZI, M.E.; GRIBAUDO, G.; MAFFEI, M.E. Uropathogenic *Escherichia coli* (UPEC) Infections: Virulence Factors, Bladder Responses, Antibiotic, and Non-antibiotic Antimicrobial Strategies. **Front Microbiol**, v. 8, p. 1566, 2017.
- TRENTIN, D.S.; SILVA, D.B.; AMARAL, M.W.; ZIMMER, K.R.; SILVA, M.V.; LOPES, N.P.; et al. Tannins possessing bacteriostatic effect impair *Pseudomonas aeruginosa* adhesion and biofilm formation. **PLoS One**, v. 8, n. 6, p. e66257, 2013.

TOVAL, F.; SCHILLER, R.; MEISEN, I.; PUTZE, J.; KOUZEL, I.U.; ZHANG, W.; KARCH, H.; BIELASZEWSKA, M.; MORMANN, M.; MÜTHING, J.; DOBRINDT, U. Characterization of Urinary Tract Infection-Associated Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli*. **Infect Immun**, v. 82, n. 11, p. 4631-4642, 2014.

WAHMAN, S.; EMARA, M.; SHAWKY, R.M.; EL-DOMANY, R.A.; ABOULWAFI, M.M. Inhibition of *quorum sensing*-mediated biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa* by a locally isolated *Bacillus cereus*. **J Basic Microbiol**, v. 55, n. 12, p. 1406-1416, 2015.

WANG, R.; NEOH, K.G.; KANG, E.T.; TAMBYAH, P.A.; CHIONG, E. Antifouling coating with controllable and sustained silver release for long-term inhibition of infection and encrustation in urinary catheters. **J Biomed Mater Res B Appl Biomater**, v. 103, n. 1, p. 519-528, 2015.

WEI, Y.; PEREZ, L.J.; NG, W.L.; SEMMELHACK, M.F.; BASSLER, B.L. Mechanism of *Vibrio cholerae* Autoinducer-1 Biosynthesis. **ACS Chem Biol**, v. 6, n. 4, p. 356-365, 2011.