

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE BIOCIÊNCIAS
CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

RAFAEL ARTUR DE QUEIROZ CAVALCANTI DE SÁ

**IDENTIFICAÇÃO DO POTENCIAL DOS COMPOSTOS FENÓLICOS FRENTE A
ISOLADOS CLÍNICOS DE *Klebsiella pneumoniae* MULTIDROGA RESISTENTE E
POTENCIAIS FORMADORES DE BIOFILME**

**Recife
2020**

RAFAEL ARTUR DE QUEIROZ CAVALCANTI DE SÁ

**IDENTIFICAÇÃO DO POTENCIAL DOS COMPOSTOS FENÓLICOS FRENTE A
ISOLADOS CLÍNICOS DE *Klebsiella pneumoniae* MULTIDROGA RESISTENTE E
POTENCIAIS FORMADORES DE BIOFILME**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Fisiologia, Área de Concentração CB, da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do título de mestre em Bioquímica e Fisiologia.

Orientadora: Prof. Dr. Mra. Tereza dos Santos Correia.

Co-orientadora: Prof. Dr. Mra. Betânia de Melo Oliveira.

**Recife
2020**

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do programa de geração automática do SIB/UFPE

Sá, Rafael Aratur de Queiroz Cavalcanti de.

Identificação do potencial dos compostos fenólicos frente a isolados clínicos de Klebsiella pneumoniae multidroga resistentes e potenciais formadores de biofilme / Rafael Aratur de Queiroz Cavalcanti de Sá. - Recife, 2020.

62 : il., tab.

Orientador(a): Maria Tereza Correia dos Santos

Coorientador(a): Maria Betânia Melo de Oliveira

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Biociências, Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Fisiologia, 2020.

Inclui referências, apêndices.

1. Microbiologia. 2. Plantas medicinais. 3. Produtos naturais. 4. Biofilmes bacterianos. 5. Biologia molecular. 6. Resistência antimicrobiana. I. Santos , Maria Tereza Correia dos. (Orientação). II. Oliveira, Maria Betânia Melo de . (Coorientação). IV. Título.

570 CDD (22.ed.)

RAFAEL ARTUR DE QUEIROZ CAVALCANTI DE SÁ

**IDENTIFICAÇÃO DO POTENCIAL DOS COMPOSTOS FENÓLICOS FRENTE A
ISOLADOS CLÍNICOS DE Klebsiella pneumoniae MULTIDROGA RESISTENTE E
POTENCIAIS FORMADORES DE BIOFILME**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Fisiologia da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do título de mestre em Bioquímica e Fisiologia. Área de Concentração: Bioquímica.

Aprovado em 21 de Fevereiro de 2020

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Maria Tereza dos Santos Correia (Orientadora)

Universidade Federal de Pernambuco

Prof. Dr. Thiago Henrique Napoleão (Examinador Interno)

Universidade Federal de Pernambuco

Prof. Dra. Lívia Carolina Alexandre de Araújo (Examinador Externo)

Universidade Texto Texto

Prof. Dra. Aleksandra Maria Lima Scavuzzi (Examinador Externo)

Universidade Texto Texto

Dedico este trabalho primeiramente a Deus e aos meus familiares, amigos, namorada e principalmente aos meus pais Artur Cavalcanti de Sá e a Irene Estela de Queiroz Cavalcanti de Sá, pelo o árduo trabalho e sacrifícios que tiveram de fazer para que eu pudesse chegar aonde cheguei. Obrigado!

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, meu agradecimento eterno ao meu bom Deus, o qual me deu o dom da vida, e que permitiu em meio tantas tribulações e glórias de eu chegar até aqui. Agradeço a Virgem Maria Santíssima, por ter levado todos os meus pedidos de consolo e perseverança ao seu filho Jesus Cristo.

Um agradecimento especial aos meus pais Artur Cavalcanti de Sá e Irene Estela de Queiroz Cavalcanti de Sá, e aos meus irmãos Lucas Artur de Queiroz Cavalcanti de Sá e Maria Vitória de Queiroz Cavalcanti de Sá, por nunca terem deixado de acreditar em mim.

Um grande agradecimento aos meus amigos da Pós-graduação, pois eles fizeram parte da minha trajetória acadêmica, com as quedas e levantadas, com as festas, momentos de alegrias e tristeza, em especial a minha amiga Camila Pinho, que compartilhou os desesperos de uma disciplina da Pós-graduação em Bioquímica e Fisiologia.

Um agradecimento mais que especial a um grupo que compartilhei além de alegrias e tristezas, segredos, todas experiências da vida e sempre estiveram me suportando em todos os momentos que passei. Um muito obrigado aos Batchas (Batcha Mor Wlisses Veloso, Batcha Tímida Lucas Godinho, Batcha Nervosa Gustavo da Costa, Batcha Ninja Thiago Ventura, Batcha Lesa Leonardo Fideles, Batcha do Cabeçao Caio Rocha).

Um grande agradecimento às pessoas do laboratório de Biologia Molecular do Departamento de Bioquímica da Universidade Federal de Pernambuco pelas amizades que construí e pelo apoio que me deram e por ter me aguentado.

Agradecimento muito que especial a Ms. Bárbara de Azevedo Ramos, pela paciência, dedicação, amizade, pela experiência proporcionada, por ter acreditado que eu conseguia chegar aqui. Um muito obrigado!

Quero agradecer também a minha orientadora, M^a Tereza dos Santos Correia, por ter me aceitado para orientação, proporcionando o aumento do meu profissionalismo na área acadêmica. E também gostaria muito de agradecer à minha co-orientadora M^a Betânia de Melo Oliveira por ter me ajudado imensamente nessa jornada para finalizar esse mestrado.

E enorme agradecimento a minha namorada Tainara Fernandes Dantas, pela cumplicidade, pelos momentos de risada, por está comigo em todos os momentos, suportando os estresses. E pela a enorme ajuda neste trabalho, pois sem ela seria muito difícil a finalização deste trabalho.

RESUMO

Nos últimos anos, o índice de infecções causadas por cepas resistentes de *K. pneumoniae* produtoras de β-lactamases do tipo ESBIs, carbapenemases do tipo KPC, e produtoras de biofilme, tem sido bastante reportado em todo mundo. Com isso, tem-se aumentado o período de internação e a escassez de opção de tratamentos efetivos contra esses microrganismos. Assim, o uso de compostos naturais tem sido ultimamente a forma alternativa de tratamento. Neste estudo, investigamos o potencial antimicrobiano e antibiofilme de compostos fenólicos contra isolados clínicos de *K. pneumoniae* MDR. No qual foram analisados o perfil epidemiológico, a formação de biofilme em diferentes meios e a presença de genes de virulência (*fimH*, *mrkD*, *cps*) relacionados ao biofilme. Para isso, foram utilizados 34 isolados de dois hospitais públicos (H1 e H2) em Recife-PE, Brasil e um isolado sensível da coleção da UFPEDA. A identidade taxonômica de todos os isolados foi confirmada pela técnica MALDI- TOF MS e perfil de resistência através do equipamento de automação VITEK 2 Compact (BioMérieux®). Para investigar o potencial de formação de biofilme, foi utilizado o método Cristal Violet (CV) comparando dois meios de cultura: Infusão Cerebral e Cardíaca (BHI) e Luria-Bertanti (LB) fornecidas com glicose ou não. Além disso, foi verificada a presença e frequência de três genes de virulência (*fimH*, *mrkD*, *cps*) através da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). , investigou-se o potencial antimicrobiano e antibiofilme de cinco compostos fenólicos (ácido gálico, ácido 4-hidroxibenzóico, ácido cafeico, ácido trans-ferúlico e quercetina. Os isolados foram confirmados como resistentes a múltiplas drogas e capazes de formar biofilme forte nos meios e nas condições testadas. A maioria dos isolados (29,4%) eram da UTI (Unidade de Terapia Intensiva), Neurocirurgia e Unidade Coronariana (UCO), 20,6% para ambos. swab retal (41,2%), seguido de urina (26,5%) e sangue (5,9%). Quanto ao perfil de resistência, foram observadas porcentagens distintas para os diferentes antimicrobianos testados, com ênfase nas cefalosporinas e carbapenêmicos, onde 100% dos isolados de H1 eram resistentes e 78,5% e 68%, respectivamente, resistentes em H2. Em relação aos genes de virulência, os mais prevalentes foram *fimH* (73%), seguidos por *cps* (67%) e *mrkD* (34,7%). Entre os hospitais, *cps* (41,2%) foi mais frequente nos isolados H1 e *fimH* (41,2%) nos isolados H2. Em relação aos cinco compostos testados, o ácido cafeico e trans-ferúlico foram mais eficazes contra isolados de *K. pneumoniae* MDR, apresentando inibição de crescimento e biofilme em torno de 75%. Este é o primeiro relato de formação de antibiofilme e antimicrobiano na MDR de *K. pneumoniae* promovido pelo ácido trans-ferúlico, o que sugere que esses compostos podem ser a alternativa de escolha no tratamento de infecções associadas ao biofilme causadas por isolados de *K. pneumoniae* MDR.

Palavras-chave: Gram-negativa; Compostos naturais; Atividades biológicas

ABSTRACT

In recent years, the rate of infections caused by strains resistant to *K. pneumoniae* produces ESBls β -lactamases, carbapenemases of the KPC type, and biofilm producers, has been widely reported worldwide. As a result, he increased the period of hospitalization and the scarcity of effective options against these microorganisms. Thus, the use of natural compounds has recently been an alternative form of treatment. Thus, the usage of natural compounds has been lately as the alternative way of treatment. In this study, we investigated the antimicrobial and antibiofilm potential of phenolic compounds against *K. pneumoniae* MDR clinical isolates. In which the epidemiological profile, biofilm formation in different media and the presence of virulence genes (*fimH*, *mrkD*, *cps*) related to the biofilm were analyzed. For this, 34 isolates were used from two public hospitals (H1 and H2) in Recife-PE, Brazil and one sensitive isolate from the UFPEDA collection. The taxonomical identity of all isolates was confirmed by MALDI-TOF MS technique and resistance profile through VITEK 2 Compact automation equipment (BioMérieux®). To investigate the potential of biofilm formation, there was used Cristal Violet method (CV) comparing two culture media: Brain and Heart Infusion (BHI) and Luria-Bertanti (LB) supplied with glucose or not. In addition, it was verified the presence and frequency of three virulence genes (*fimH*, *mrkD*, *cps*) through Polymerase Chain Reaction (PCR). Lastly, there was investigated the potential antimicrobial and antibiofilm de five phenolic compounds (Gallic acid, 4-hidroxybenzoic acid, Caffeic acid, Trans-ferulic acid, and Quercetin. The isolates were confirmed as *K. pneumoniae* multidrug resistant and capable of forming strong biofilm in both media and conditions tested. Most of the isolates (29,4%) were from ICU (Intensive Care Unit), Neurosurgery and Coronary Unit (COU), 20,6% for both. The most site of infection was from rectal swabs (41,2%), followed by urine (26,5%) and blood (5,9%). Regarding the resistance profile, distinct percentages were observed for the different antimicrobials tested, with emphasis on cephalosporins and carbapenems, where 100% of the isolates from H1 were resistant and 78.5% and 68%, respectively, resistant in H2. In relation to virulence genes, the most prevalent were *fimH* (73%) followed by *cps* (67%) and *mrkD* (34,7%). Between the hospitals, *cps* (41,2%) was more frequent in H1 isolates and *fimH* (41,2%) in H2 isolates. In relation to the five compounds tested, Caffeic and trans-ferulic acid were most effective against *K. pneumoniae* MDR isolates, presenting both growth and biofilm inhibition around 75%. This is the first report of antibiofilm formation and antimicrobial on *K. pneumoniae* MDR promoted by trans-ferulic acid which suggest that these compounds could be the alternative of choice to treat biofilm-associated infection caused by *K. pneumoniae* MDR isolates.

Keywords: Gram-negative; Plant compounds; Biological activities

LISTA DE ILUSTRAÇÕES DO REFERENCIAL TEÓRICO

FIGURA 1 – COLÔNIAS DE <i>Klebsiella pneumoniae</i> SEMADA EM ÁGAR McCONKEY APRESENTANDO ASPECTO MUCÓIDE.....	15
FIGURA 2 – PRINCIPAIS CLASSES DE BETALACTÂMICOS.....	17
FIGURA 3 – VISTA AMPLIADA DA ESTRUTURA DO LIPOPOLISSACARÍDEO, MOSTRANDO O ANTÍGENO-O, OLIGOSACARÍDEOS E A REGIÃO DO LIPÍDEO A.....	21
FIGURA 4 – DIVERSIDADE MICROBIANA NO BIOFILME.....	23
FIGURA 5 – DIFERENTES ESTÁGIOS DA FORMAÇÃO DO BIOFILME BACTERIANO	24
FIGURA 6 – FATORES QUE INFLUENCIAM A FORMAÇÃO DE BIOFILME BACTERIANO.....	24
FIGURA 7 – BIOSSÍTESE DE COMPOSTOS FENÓLICOS.....	26
FIGURA 8 – ÁCIDO FENÓLICO, ESTRUTURA DOS ÁCIDOS BENZÓICOS.....	29
FIGURA 10 – ESTRUTURA DO TANINO HIDROLISÁVEL (ÁCIDO GÁLICO) E CONDENSÁVEL (PROTOCIANIDINAS).....	30

LISTA DE INLUSTRAÇÕES DO ARTIGO

FIGURA 1 – PERFIL DE RESISTÊNCIA DE TODOS OS ISOLADOS DOS DOIS HOSPITAIS.....	52
FIGURA 2 – EFEITO ANTIMICROBIANO E ANTIBIOFILME DOS COMPOSTOS FENÓLICOS SOBRE <i>K. pneumoniae</i> UFPEDA 396.....	53
FIGURA 3 – EFEITO ANTIMICROBIABO E ANTIBIOFILME DOS COMPOSTOS COMPOSTOS FENÓLICOS SOBRE ISOLADOS DE <i>K. pneumoniae</i> MDR.....	54

LISTA DE TABELAS DO REFERENCIAL TEÓRICO

TABELA 1 – CLASSIFICAÇÃO GERAL DAS BETALACTAMASES.....	18
---	----

LISTA DE TABELAS DO ARTIGO

TABELA 1 – LISTA DE PRIMERS UTILIZADOS PARA IDENTIFICAR GENES DE BIOFILME EM <i>K. pneumoniae</i> MDR.....	47
---	----

TABELA 2 – CARACTERÍSTICAS DE <i>K. pneumoniae</i> MDR COLETADAS DE HOS- PITAIS DO RECIFE – PE.....	49
--	----

TABELA 3 – FREQUÊNCIA DA CARACTERÍSTICAS EPIDEMIOLÓGICAS DE <i>K. pneumoniae</i> MDR.....	50
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS

AMI - Amicacina	KPC - <i>Klebsiella pneumoniae</i> carbapenemases
AMP - Ampicilina	LB - Luria Bertani
BHI - Brain Heart Infusion	MALDI-TOF-MS - Espectrometria de Massa por Ionização e Dessorção a Laser Assistida por Matriz / Tempo de Voo
BTU- Burn Treatment Unit	
CAZ- Ceftazidime	
MER – Meropenem	LPS – Lipopolissacrídeo
CFZ - Cefazolina	CPS – Cápsula Polissacarídica
MDR- Multidroga-Resistentes	
CIM - Concentração Inibitória Mínima	
NDM - <i>New Delhi metallo-β-lactamase</i>	
CIP- Ciprofloxacin	
OXA - <i>Oxacillin-hydrolyzing</i> CPM- Cefepime	
PCR - Polymerase Chain Reaction	
CRO- Ceftriaxone	
PDR- Pan-Droga-Resistentes	
DNA - Ácido desoxirribonucleico	
SRPA- Sala de Recuperação	
DO – Densidade Óptica	
EDTA - Ácido Etlenodiamino Tetra-Acético	TSB - Tryptose Soy Broth
EPS- Exopolissacarídeo	UCO- Coronary Unit
ESBL- β-lactamases de espectro estendido	UFPE - Universidade Federal de Pernambuco
UTI - Unidade de Terapia Intensiva GEN – Gentamicina	
UV – Ultravioleta ICU- Intensive Care Unit	

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	12
2 REFERENCIAL TÉORICO.....	14
2.1.Taxonomia do gênero <i>Klebsiella</i>	14
2.2.Características gerais da espécie <i>K. pneumoniae</i>	15
2.3.Visão Geral dos Antibióticos: β -lactamicos e β -lactamases.....	16
2.4.Características Gerais dos Fatores de Virulência de <i>K. pneumoniae</i>	19
2.5.Características Gerais do Biofilme.....	22
2.6.Compostos fenólicos: caracterização e aplicabilidade.....	25
3 OBJETIVOS.....	32
3.1.Objetivos Gerais.....	32
3.2.Objetivos específicos.....	32
4. REFERÊNCIAS.....	33
5. ARTIGO.....	42
6. CONCLUSÃO.....	61

1 INTRODUÇÃO

A Organização Mundial da Saúde (OMS) tem mostrado uma grande preocupação com o crescente aumento da resistência microbiana aos antibióticos no mundo. A rápida emergência e disseminação de microrganismos resistentes aos antimicrobianos nos hospitais é um problema de grande proporção e as causas são multifatoriais; contudo, as razões principais são evidentes: estão altamente correlacionadas com a pressão seletiva devido ao uso indiscriminado de agentes antimicrobianos e a disseminação destes fenótipos é facilitada pela transmissão pessoa-a-pessoa devido à aplicação inconsistente de práticas básicas de prevenção e controle de infecções pelos profissionais de saúde (GOMES; CASALINI, 2018).

Dentre as diversas espécies de bactérias, as bactérias da família das *Enterobacteriaceae* são importantes agentes etiológicos comumente associados a infecções humanas e podem ser isoladas de uma grande variedade de amostras biológicas. Os gêneros mais frequentemente isolados (*Escherichia*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Serratia*, *Proteus*, *Citrobacter*, *Morganella*, e *Salmonella*) (JUNIOR, 2014). *K. pneumoniae* tem atraído bastante atenção em todo o mundo como um microrganismo infeccioso devido ao recente aumento no número de infecções graves, resistência a antibióticos e crescente dificuldade no estabelecimento de tratamentos eficazes. *K. pneumoniae* vem sendo considerada a segunda causa mais comum de bacteremia Gram-negativa e um importante patógeno na infecção adquirida no hospital (ZHENG et al., 2018).

Klebsiella pneumoniae, um membro da família Enterobacteriaceae, é um bacilo em forma de bastonete, Gram-negativo e fermentador de lactose, com uma cápsula proeminente. *K. pneumoniae* é um patógeno oportunista que é amplamente encontrado na natureza, incluindo plantas, animais, solo e superfície e em humanos, incluindo boca, pele e intestinos, bem como em ambientes hospitalares e dispositivos médicos. *K. pneumoniae* oportunista afeta principalmente aqueles com sistemas imunológicos comprometidos ou que são enfraquecidos por outras infecções (LI et al., 2014; MARTIN; BACHMAN, 2018).

Nos últimos anos, o índice de infecções causadas por cepas resistentes de *K. pneumoniae* produtoras de β-lactamases do tipo ESBIs e carbapenemases do tipo KPC elevou-se em âmbito mundial, trazendo consequências graves principalmente em ambientes hospitalares, como o aumento do período de internação, a escassez de opção de tratamentos (MIRANDA et

al., 2018). Além da resistência aos antibióticos, *K. pneumoniae* utiliza uma variedade de fatores de virulência, especialmente polissacarídeos em cápsulas, adesinas e determinantes para aquisição de ferro, que são usados para sobrevivência e evasão imunológica durante a infecção (CANEIRAS *et al.*, 2019). *K. pneumoniae* utiliza esses fatores de virulência para sobreviver e evitar o sistema imunológico durante a infecção, bem como a própria formação de biofilme. (NIRWATI *et al.*, 2019).

K. pneumoniae também é conhecida por sua capacidade de formar biofilmes, que são comunidades de bactérias incorporadas em uma matriz extracelular. Essa matriz consiste em proteínas, exopolissacarídeos, DNA e lipopeptídeos. Os biofilmes são extensivamente investigados nas últimas décadas, principalmente devido ao envolvimento em quase 80% das infecções bacterianas, particularmente prevalentes em infecções relacionadas a dispositivos, infecções na superfície corporal e infecções crônicas. Esses biofilmes são de grande preocupação, pois conferem proteção contra mecanismos de defesa do hospedeiro e à terapia antimicrobiana convencional, que influencia significativamente os resultados do tratamento antimicrobiano (NIRWATI *et al.*, 2019; SINGH *et al.*, 2019).

As bactérias formadoras de biofilme apresentam desafios formidáveis em diversos contextos, e há necessidade de novos agentes antimicrobianos que sejam ambientalmente aceitáveis e relativamente potentes contra microrganismos no estado de biofilme. Os fenóis constituem uma extensa classe de compostos que demonstraram apresentar propriedades antimicrobianas e contra uma ampla gama de bactérias (WALSH *et al.*, 2019).

2 REFERENCIAL TÉORICO

2.1.Taxonomia do gênero *Klebsiella*

O gênero *Klebsiella* foi primeiramente descrito por Trevisan em 1885, e o nome foi dado em homenagem ao microbiologista germânico Edwin Klebs. Trevisan também caracterizou a espécie *K. pneumoniae* (MARTÍNEZ *et al.*, 2004). Originalmente, as espécies de *Klebsiella* spp. eram classificadas de acordo com a doença a qual estas eram isoladas. Sendo desta forma classificada em três espécies: *K. pneumoniae* (pneumonia), *K. ozaenae* (ozanea), and *K. rhinoscleromatis* (rinoscleroma) (PODSCHUN; ULLMANN, 1998; SYLVAIN; GRIMONT, 2006).

Com o advento de técnicas refinadas de taxonomia, as espécies do gênero *Klebsiella* passaram por três sistemas diferentes de classificação (Cowan, Bascomb, and Ørskov); (PODSCHUN; ULLMANN, 1998; SYLVAIN; GRIMONT, 2006). Contudo, a classificação proposta por Ørskov (1984) foi a mais aceita. De acordo com ØRSKOV; ØRSKOV, 1984 este gênero comprehende as espécies: *K. oxytoca*, *K. terrigena*, *K. planticola*, *K. ornithynolytica*, *K. pneumoniae*; sendo a *K. pneumoniae* com três subespécies: subespécie *pneumoniae*, *ozanea* e *rhinoscleromatis*. Através da análise comparativa dos genes *16S rRNA* e *rpoB*, as espécies *K. terrigena*, *K. planticola*, *K. ornithynolytica*, foram enquadradas no gênero *Raoultella* (DRANCOURT *et al.*, 2001).

Através de técnicas filogenética como RAPD, sequenciamento dos genes *gyrA*, *parC* e ribotipagem, *K. pneumoniae* se enquadra em três clusters (KpI, KpII-A, KpIII), *K. oxytoca* em dois clusters e *K. planticola* em seis clusters (Souza Lopes, 2007). Trabalhos subsequentes utilizando as técnicas de Multilocus Sequence Typing (MLST) e hibridação DNA-DNA, mostraram que estes clusters (KpI, KpII-A, KpII-B e KpIII) correspondiam a outras espécies além de *K. pneumoniae*, ou seja, KpI estava relacionado a *K. pneumoniae*, KpII-A a *K. quasipneumoniae* subsp. *Quasipneumoniae*, KpII-B as espécies *K. quasipneumoniae* subsp. *similipneumoniae* e *K. variicola* (BRISSE; PASSET; GRIMONT, 2014; ROSENBLUETH *et al.*, 2004).

Atualmente, o gênero *Klebsiella* comprehende seis espécies, *K. pneumoniae*, com suas três subespécies (*K. pneumoniae* subsp. *pneumoniae*, *K. pneumoniae* subsp. *ozaenae*, *K. pneumoniae* subsp. *rhinoscleromatis*), *K. oxytoca*, *K. variicola*, *K. granulomatis*, *K.*

singaporenensis, *K. michiganensis* e *K. quasipneumoniae* com suas subespécies *K. quasipneumoniae* subsp. *quasipneumoniae* e *K. quasipneumoniae* subsp. *Similipneumoniae* (BRISSE *et al.*, 2004; MARTÍNEZ *et al.*, 2004; ROSENBLUETH *et al.*, 2004).

2.2.Características gerais da espécie *K. pneumoniae*

Klebsiella spp são microrganismos que podem ser encontrados em qualquer lugar na natureza como: água, solo, plantas, além disso, podem ser encontrados na mucosa de diversos mamíferos. Em relação aos humanos, esta bactéria, pode ser encontrada na pele, boca, e também no intestino; assim como, em instrumentos hospitalares (LI *et al.*, 2014; PODSCHUN; ULLMANN, 1998).

Klebsiella pneumoniae é um bacilo gram-negativo, fermentador de glicose e envolvido na metabolização da lactose, não móvel, encapsulado, anaeróbio facultativo, catalase positivo, oxidase negativo, lisina positivo, ornitina negativo, redução à nitrato, tríplice açúcar ferro (TSI) positivo com produção de gás, citrato e indol negativos. Este microrganismo utiliza citrato como fonte de carbono e hidrólise da uréia, formando ou não gás. Apresenta tamanho variando entre 0,3 a 1,0 µm de diâmetro e 0,6 a 6,0 µm de comprimento pertencendo à família *Enterobacteriaceae*. (GOMES; CASALINI, 2018; PATEL *et al.*, 2017). Quando crescida em ágar McConkey, *K. pneumoniae* apresenta uma cor roseada e um aspecto mucoide e viscoso, isso é devido a produção de uma cápsula polissacarídica, antígeno K (Figura 1), a qual confere proteção contra fagocitose, inibi diretamente a ação do sistema imune do hospedeiro e é responsável pela adesão a célula hospedeira (GOMES; CASALINI, 2018).

Figura 1 - Colônias de *Klebsiella pneumoniae* semeada em ágar McConkey apresentando aspecto mucoide.



Fonte 1: Buban, 2017, adaptado pelo autor.

Entre as espécies do gênero *Klebsiella*, a espécie *K. pneumoniae* subs. *pneumoniae* é a mais frequentemente associada a infecções hospitalares (HOLT *et al.*, 2015), sendo considerada um patógeno oportunista causadora de infecções em pacientes imunocomprometidos (SOUSA *et al.*, 2019). As infecções mais comumente relacionadas a *K. pneumoniae* são as Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde (IRAS), pneumonia, bacteremias, septicemia, infecções do trato urinário, abscesso no fígado e diarreia. Devido à alta variedade de infecções *K. pneumoniae* está muito associada a elevada taxa de morbidade e mortalidade em pacientes (FU *et al.*, 2018; LEE *et al.*, 2017), associada a infecções de corrente sanguíneas (ICSs), perdendo apenas para *Escherichia coli* (MARTIN; BACHMAN, 2018); e infecções adquiridas nas comunidades, como por exemplo abscesso piogênico do fígado (HSU *et al.*, 2016).

Segundo MARTIN *et al.*, 2018 *K. pneumoniae* tem sido considerada a terceira maior causa de infecções hospitalares adquiridas nos EUA, atrás apenas de *Clostridium difficile* e *Staphylococcus aureus*. No Brasil, as principais bactérias envolvidas em infecções hospitalares são, primeiramente *Pseudomonas aeruginosa* (30,3%), seguida por *Escherichia coli* (18,6%), *K. pneumoniae* (16,9%), *Acinetobacter baumannii* (8,8%) e *Enterobacter cloacae* (7%) (MELO, 2013).

Muitas das infecções causadas por *K. pneumoniae* estão relacionadas a sua capacidade de resistência aos antibióticos. Os dois tipos de resistência aos antibióticos mais comumente encontrados nesta espécie, são: a produção de β-lactamases de amplo espectro (ESBL), que estão envolvidas a resistência aos antibióticos monobactâmicos e cefalosporinas causando lise no anel β-lactâmico por hidroxilação irreversível da ligação amida levando à inativação do antibiótico, e a produção de carbapenemases envolvidas na resistência a quase todos antibióticos pertencentes ao grupo dos β-lactâmicos (BONOMO, 2017; PACZOSA; MECSAS, 2016; UR RAHMAN *et al.*, 2018)

2.3. Visão Geral dos Antibióticos: β -lactamicos e β -lactamases

Dentre as diversas classes de antimicrobianos, os β-lactâmicos são os mais comumente utilizados no tratamento de infecções causadas por bactérias gram-negativas devido a sua segurança, eficiência clínica e baixa toxicidade (BOEHMER *et al.*, 2018; NAAS *et al.*, 2017). Esta classe de antibióticos teve sua origem a partir de uma observação acidental de Alexander Fleming, em 1998, quando o mesmo observava as propriedades antibacterianas produzidas de uma substância secretada pelo fungo *Penicillium notatum*, que mais tarde, levaria à descoberta

da penicilina. Por conseguinte, novos β -lactâmicos surgiram, e desta forma caracterizados em quatro subclasses de acordo com as estruturas químicas: penicilinas, cefalosporinas, monobactamicos e carbapenemicos (Figura 2), (ARRUDA *et al.*, 2019; JUNIOR, 2014; SAKOULAS; GERIAK; NIZET, 2019).

Figura 2 - Principais classes de β -lactâmicos.

Classe	Estrutura	Descrição
Penicilinas		Consistem de um anel de tiazolidina fundido com o anel de β -lactâmico em que as diferentes cadeias laterais de grupos acilas estão ligadas a radicais. (Ex: Ampicilina, amoxicilina, piperacilina).
Cefalosporinas		Possui um anel de di-hidrotiazina fundido ao anel β -lactâmico. (Ex: Cefalotina, cefuroxima, cefotaxima, ceftriaxona, ceftazidima, cefotetam e cefepima).
Monobactans		Molécula de β -lactâmico monocíclica, inicialmente isolada a partir de <i>Chromobacterium violaceum</i> . (Ex: Aztreonam).
Carbapenems		Assemelha-se às penicilinas, com exceção do anel de cinco elementos em que o átomo de enxofre foi substituído por um átomo de carbono e tem uma ligação dupla entre o carbono 2 e 3. (Ex: Imipenem, meropenem e ertapenem).

Fonte: Arruda *et al.*, 2019 e Junior, 2014, adaptado pelo autor.

Os β -lactâmicos são antibióticos que possuem um anel beta-lactâmico em sua estrutura. Este anel é constituído por um átomo de nitrogênio e três átomos de carbono. Seu principal mecanismo de ação é a inibição da parede celular bacteriana, agindo, na última etapa da formação da parede de proteoglicano, por acetilação das proteínas ligadoras de penicilinas (Penicillin-binding-protein, PBP) (ARRUDA et al., 2019; JUNIOR, 2014). Devido ao uso indiscriminado de antibióticos, a resistência à classe dos β -lactâmicos tem aumentado globalmente. Sendo a resistência a essa classe causada principalmente pela produção de β -lactamases, (BONOMO, 2017). Atualmente, tem-se identificado mais de 900 tipos de β -lactamases (BLs) (UR RAHMAN *et al.*, 2018). As BLs são classificadas de acordo com a estrutura molecular baseando-se na sequência de aminoácidos, proposto por Ambler (1991), nas quais são divididas em quatro grupos moleculares (A, B, C, D), e na classificação proposta por Bush–Jacoby–Medeiros, na qual as BLs são agrupadas de acordo com o perfil de

hidrólise de substrato e resposta a vários inibidores de BLs. As enzimas classificadas pro Ambler do grupo A, C e D, são as que possuem como sítio catalítico serina, e as do grupo B, metalo-proteinases (Tabela 1). Além disso, as BLs segundo Bush–Jacoby–Medeiros são ainda agrupadas em três grupos (G1, G2 e G3), tendo o G2 seus respectivos subgrupos (2a, 2b, 2br, 2d, 2be, 2c e 2f), (BONOMO, 2017; BUSH; BRADFORD, 2019).

Tabela 1 - Classificação Geral das β -lactamases.

Ambler	Bush–Jacoby–Medeiros	Substratos	Inibição	Exemplos
A: Serina (Variável)	2a: Serina (penicilinases)	Penicilinas	Clavulanato, avibactam e outros inibidores mais recentes ^a	Penicilinases de Gram-positivas
	2b: Serina (penicilinases)	Penicilinas e cefalosporinas de espectro estreito	Clavulanato, avibactam e outros inibidores mais recentes	TEM-1, TEM-2 e SHV-1
	2be: Serina (ESBLs)	Penicilinas e cefalosporinas, incluindo espectro estendido	Clavulanato, avibactam e outros inibidores mais recentes	SHV-2, TEM-10, CTX-M e GES-1
	2br: Serina (Resistente a inibidores)	Penicilinas	Avibactam e outros inibidores mais recentes	TEM-30 e SHV-72
	2c: Serina (penicilinases)	Penicilinas e carbenicilinas	Clavulanato, avibactam e outros inibidores mais recentes	PSE (CARB)
	2f: Serina (carbapenemases)	Penicilinas, cefalosporinas e carbapenemicos	Clavulanato, avibactam e outros inibidores mais recentes	KPC, SME, NMC-A e GES-2
B: Metalo (carbapenemase)	3: Metalo (carbapenemases)	Maioria dos β -lactamicos, incluindo carbapenemicos, mas não monobactamicos	Agentes quelantes (EDTA) e ANT431	IMP, VIM e NDM
C ^b : Serina (cefalosporinases)	1: Serina (cefalosporinases)	Penicilinas e cefalosporinas	Cloxacilina, avibactam e outros inibidores mais recentes	Chromosomal AmpC, CMY, ACT-1 e DHA
D ^c : Serina (oxacilinases)	2d: Serina (oxacilinases)	Penicilinas e cloxacilinas; some include cefalosporinas e/ou carbapenemicos	Sódio clorídrico; algumas por Clavulanato, avibactam e outros inibidores mais recentes	OXA-1/30, OXA-10, OXA-23 e OXA-48

Fonte: Bush e Bradford, 2019, adaptado pelo autor.

Dentre as β -lactamases, as ESBLs têm garantido a atenção da comunidade científica. Muitas das infecções hospitalares causadas por *K. pneumoniae*, estão relacionadas à produção dessas enzimas. As ESBLs são conhecidas por sua capacidade de hidrolisar a oximino-cefalosporina (3º e Cefalosporinas de quarta geração) e monobactâmicos, e inibidas por clavulanato, sulbactamico, tazobactam, em geral plasmidial. Contudo, não apresenta ação inibitória aos carbapenemicos (MELO, 2013; JUNIOR, 2014; GOMES; CASALINI, 2018; UR RAHMAN et al., 2018). As primeiras cepas de *K. pneumoniae* produtoras de ESBLs foram inicialmente identificadas na década de 80, na Alemanha por Knothe et al. (1983). Classicamente, as ESBLs eram definidas como derivadas das TEM-1, TEM-2, e SHV. Atualmente, são divididas em três principais grupos: Grupo 1- ESBLA (ESBLs classe A) compreende as ESBL mais

frequentemente encontradas e CTX-M, bem como as enzimas SHV e TEM. Estas enzimas são transferidas de forma horizontalmente e podem ser inativadas ou inibidas pelo ácido clavulânico; já o Grupo 2- ESBL_M, ESBL_M (Diversas ESBLs) é seccionado em ESBL_{M-C} (classe C, AmpC mediada por plasmídeo) e ESBL_{M-D} (classe D). Os AmpC adquiridos são os ESBL mais frequentemente encontrados nesta classe. Por fim, o Grupo 3- ESBL_{CARBA} (ESBL que degradam carbapenêmicos) é dividido em ESBL_{CARBA-A}, ESBL_{CARBA-B} e ESBL_{CARBA-D} (GOMES; CASALINI, 2018; JUNIOR, 2014; MELO, 2013; UR RAHMAN et al., 2018). Em Como consequência da resistência ampliada pela produção de ESBLs, o uso dos carbapenêmicos aumentou significativamente, devido à resistência dessa classe à ação destas enzimas. Consequentemente, uma nova pressão seletiva foi estabelecida e a emergência de cepas resistentes a carbapenêmicos, foram relatadas. As carbapenemases degradam os antibióticos β -lactâmicos do grupo carbapenêmicos (imipenem, meropenem, ertapenem e doripenem). Organismos produtores de carbapenemases do tipo KPC são capazes de hidrolisar todas as cefalosporinas, monobactâmicos e carbapenêmicos e são inibidas pelo ácido clavulânico e tazobactam. As carbapenemases podem ser divididas nas classes A, B, e D. As pertencentes às classes A e D são a serina β -lactamases e, as carbapenemases de classe B são metalo- β -lactamases (MBLs). (CUI; ZHANG; DU, 2019; JUNIOR, 2014; MELO, 2013) O primeiro caso de *K. pneumoniae* expressando uma carbapenemase foi identificado na Carolina do Norte em 1996 e, portanto, esse tipo de carbapenemase é chamado KPC. Sendo o primeiro registro para o Brasil descrito em 2006 (MIRANDA et al., 2018; PACZOSA; MECSAS, 2016).

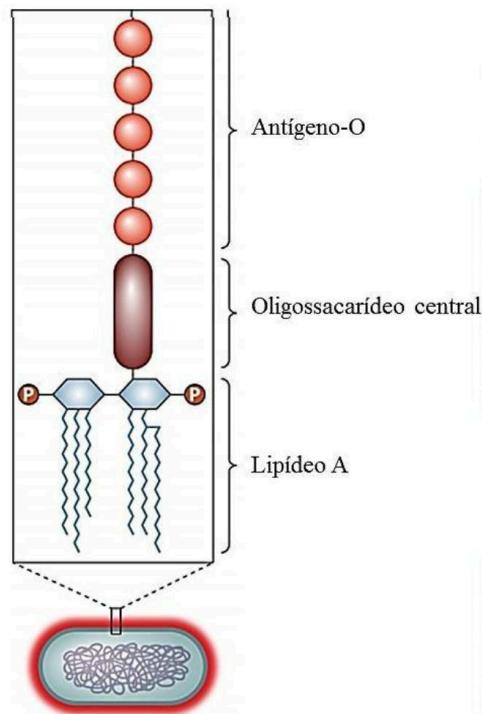
2.4.Características Gerais dos Fatores de Virulência de *K. pneumoniae*

Assim como as infecções hospitalares associadas a *K. pneumoniae* estão relacionadas a resistências a antibióticos, a presença de fatores de virulência também contribui para o aumento das infecções hospitalares causadas por esse microrganismo (CHUNG THE et al., 2015). A patogenicidade de *K. pneumoniae* é devido à presença de muitos genes de virulência que codificam fatores de virulência, que permite atacar o sistema imune de mamíferos, causando muitas doenças. Entre os fatores de virulência está a produção de CPS (Cápsula polissacarídica), LPS (Lipopolissacarídeos), expressão de bomba de efluxo, expressão de fimbrias e modificação de porinas, além de outras proteínas da membrana externa (AHMED; ALAA, 2016). A CPS de *K. pneumoniae* é um polissacarídeo geralmente composto por três unidades de seis açúcares. Este fator de virulência é sintetizado pela via de polimerização dependente de Wzy, que é bem caracterizado para *Escherichia coli*. Este gene O cluster do

gene CPS *K. pneumoniae*, possui 21 a 30 kb e abriga 16 a 25 genes, está relacionado com a síntese de nucleotídeos de açúcares, síntese de unidades repetidas e montagem e exportação de unidades de repetição capsular. A produção da cápsula e exportação de CPS maduro para a superfície celular bacteriana ocorre sob ação combinada de Wza (uma tirosina autocinase da membrana interna), Wzb (uma proteína-tirosina fosfatase) e Wzc (uma lipoproteína de membrana externa). A presença de uma cápsula espessa na superfície celular protege *K. pneumoniae* de sofrer opsonização e ser fagocitada por macrófagos, neutrófilos, células epiteliais e dendríticas. Além disto, a CPS atua como escudo contra o acesso de peptídeos antimicrobianos do hospedeiro (PACZOSA; MECSAS, 2016; CATALÁN-NÁJERA; GARZA-RAMOS; BARRIOS-CAMACHO, 2017).

O LPS compreende três partes (Figura 3): lipídeo A – altamente conservado e hidrofóbico ancorado na membrana externa; Antígeno-O – altamente variável como componente mais externo do LPS; e um núcleo de oligossacarídeo central– que conecta o lipídeo A e o antígeno-O. O lipídio A é sintetizado no citoplasma por enzimas constitutivas conservadas e transportado para a membrana externa pelo transportador ABC MSbA. Durante o transporte ocorrem modificações covalentes intermediadas por enzimas de modificação por estímulos ambientais, estando envolvidas na modulação de virulência de vários patógenos de Enterobacteriaceae. Essas modificações contribuem para a resistência da defesa inata do hospedeiro a peptídeos antimicrobianos. Além disso, *K. pneumoniae* compreende nove grupos reconhecidos de antígeno-O, dentre eles o sorotipo O1 é o mais comum em isolados clínicos. O antígeno-O impede o acesso dos fármacos aos seus ativadores, como porinas e LPS bruto, contribuindo para a resistência bacteriana.

Figura 3 - Vista ampliada da estrutura do lipopolissacarídeo, mostrando o Antígeno-O, Oligossacarídeo central e a região do Lipídeo A.



Fonte: Paczosa e Mecsas, 2016, adaptado pelo autor.

Em *K. pneumoniae* ocorre a expressão da bomba de efluxo AcrAB, que está envolvido com a exportação de antibióticos, como quinolonas e β -lactâmicos, e também, agentes antimicrobianos presentes no ser humano. O AcrAB atua como determinante da resistência de *K. pneumoniae* a defesas imunológicas inatas do hospedeiro. Os cromossomos desta espécie contêm uma região codificadora de fimbria conservada que é composta pelo locus genético regulador mrkHII, onde quatro tipos de fimbrias foram caracterizados em *K. pneumoniae*, sendo elas: as fimbrias tipo 1, tipo 3, fimbria Kpc e a adesina KPF-28. As fimbrias são curtas, finas e rígidas, e têm função de aderência das bactérias aos tecidos ou superfícies no qual seus elementos nutritivos são extraídos (CLEGG; MURPHY, 2016; HSU et al., 2016).

Outras proteínas associadas à membrana externa da bactéria estão relacionadas com fatores de virulência. Uma das principais proteínas da membrana externa de bactérias gram-negativas é a OmpA. Esta proteína possivelmente está envolvida na ativação de sistemas dedicados a melhorar a citotoxicidade de peptídeos antimicrobianos e contribui para a resistência à

fagocitose por macrófagos. A perda de OmpA torna *K. pneumoniae* mais suscetível a peptídeos antimicrobianos. Ademais, esta espécie produz duas principais porinas da membrana externa - OmpK35 e OmpK36 - através das quais moléculas hidrofilicas, por exemplo, nutrientes e cefalosporinas/carbapenêmicos se difundem na bactéria. Perda dessas proteínas leva ao aumento da resistência às cefalosporinas/carbapenêmicos (HENNEQUIN; ROBIN, 2016).

Desde a descoberta do primeiro antimicrobiano, penicilina, muitas infecções causadas pelos microrganismos começaram a ser combatidas (REGIEL-FUTYRA et al., 2017). Entretanto, com o uso excessivo desses antimicrobianos, os microrganismos começaram a adquirir resistência. De acordo com Chaves (2012), o primeiro registro de resistência microbiana veio do relato feito por Sir Alexandre Fleming em 1929, em que foi observado a resistência de bactérias à penicilina. A resistência microbiana tem sido relatada pela Organização Mundial da Saúde (OMS) como sendo um dos três pilares mundiais sobre saúde pública (KNOBLER; LEMON; NAJAFI, 2003; FU et al., 2018). Por causa da capacidade de evoluir rapidamente, devido ao simples genoma e fácil transferência de seu material, os microrganismos, especialmente as bactérias, vêm adquirindo resistência aos medicamentos. Esta capacidade é influenciada pela alta concentração de antimicrobiano em que o microrganismo é exposto em relação às doses terapêuticas (CHUNG THE et al., 2015). O mecanismo que os microrganismos utilizam para adquirir a defesa contra medicamentos ocorre por mutações genéticas nos cromossomos, levando assim a expressão de genes de resistência contra as ações dos antimicrobianos (REGIEL-FUTYRA et al., 2017).

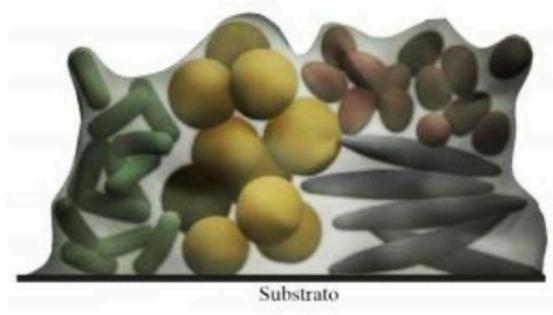
A resistência bacteriana tem sido um dos assuntos mais estudados na área de antimicrobianos (WANNMACHER, 2004). Autores têm revelado que as bactérias estão se tornando multidrogas resistentes (MDR) e isto tem causado grande alerta na comunidade científica e para a OMS. Tais cepas resistentes vêm causando alta taxa de mortalidade em pacientes com lesões traumáticas, infecções da corrente sanguínea, assim como, em pacientes que estão passando pelo pós-operatório. Outros autores apontam que nestes últimos anos estamos entrando num período chamado “a era da resistência”, e que medidas na efetividade dos tratamentos precisam ser tomadas. Com isso, as bactérias patogénicas resistentes têm recebido uma grande atenção (BILAL et al., 2017; REGIEL-FUTYRA et al., 2017). De acordo com OMS as infecções causadas por bactérias MDRs estão, cada vez mais, frequentes, causando assim grandes gastos públicos. Suportando esta ideia, o órgão nacional dos Estados Unidos da América relacionado a questões de saúde pública NHI, ressalva que dessas infecções, 80%

estão relacionadas a formação de biofilme bacteriano (MAMONE et al., 2016; (JAMAL et al., 2018).

2.5.Características Gerais do Biofilme

Os microrganismos possuem uma alta capacidade de se adaptar a várias condições abióticas e bióticas. As bactérias, por sua vez, apresentam dois tipos de modos de vida: um planctônico e outro séssil. As planctônicas, são microrganismos que vivem de forma livre, em suspensão em meios aquosos. Quando aderem a alguma superfície, elas saem do modo de vida livre para o séssil. Este modo de vida séssil é um agregado de várias espécies de bactérias e outros (fungos e algas) microrganismos, caracterizando o biofilme (Figura 4), no qual confere a virulência e resistência (MAMONE et al., 2016; MENOITA et al., 2012; SILVA, 2008).

Figura 4 - Diversidade microbiana no biofilme.



Fonte: Menoita, 2012 adaptado pelo autor.

A formação de biofilme é uma estratégia de sobrevivência de algumas bactérias, mais especificamente, de se adaptarem aos ambientes hostis. Com a proteção do biofilme, as bactérias se tornam mais tolerantes e resistentes aos antibióticos e as respostas imunes, dificultando o tratamento clínico das infecções (CATALÁN-NÁJERA; GARZA-RAMOS; BARRIOS-CAMACHO, 2017). Estudos revelam que as infecções por bactérias produtoras de biofilme são mais frequentes por instrumentos médicos (Cateteres e sondas) e aparelhos de permanência, como os implantados, e que o tratamento por antibióticos convencionais por si só não é o suficiente para erradicar infecções por biofilme (WU et al., 2015).

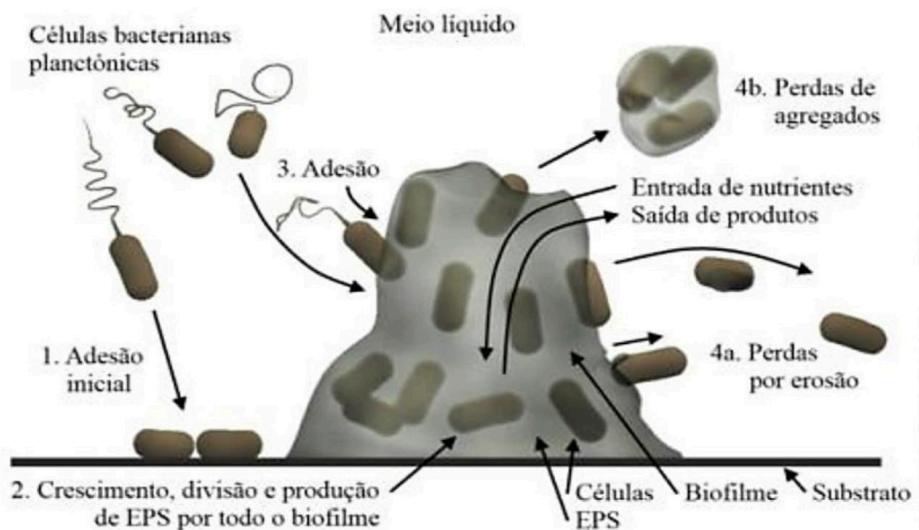
A diversidade na estrutura dos polissacarídeos (PS) fornece várias atividades funcionais aos biofilmes microbianos, resguardam as necessidades às mudanças ambientais (antimicrobianos, dessecação, temperatura, micróbios concorrentes), garantem a adesão em substratos diferentes

e conferem uma morfologia única para as colônias, com potencialidade de formar ambiente mais adequado para os microrganismos resistentes (LIMOLI; JONES; WOZNIAK, 2015).

O primeiro estudo retratado sobre biofilmes foi realizado por Antonie Van Leuwenhoek, 1983 quando estudava microrganismo em dentes, visualizando assim mais indivíduos agregados que em formas livres. Contudo, foi Zobell em 1943 quem fez a primeira descrição detalhada de adesão bacteriana a superfícies, estudo realizado em bactérias marinhas em cascos de navios. Sendo assim, o biofilme bacteriano é caracterizado por uma comunidade de organismos ligados a uma determinada superfície tanto abiótica quanto biótica, mergulhados numa matriz extracelular formada de substâncias poliméricas (EPS) (CANDIDATE; TABATABAEI, 2017; HUSSAIN; OH, 2017; KOCOT; OLSZEWSKA, 2017; MENOITA et al., 2012; SONG et al., 2017; VAN LEUWENHOEK, 1983).

Na formação de biofilme bacteriano as superfícies, tanto abióticas quanto bióticas, possuem diferentes estágios. O primeiro é chamado de adesão primária ou reversível; o segundo é considerado adesão secundária ou irreversível; o terceiro é a maturação do biofilme e, por último, a dispersão deste. A Figura 5 ilustra os diferentes estágios deste fator de virulência microbiano (HUSSAIN; OH, 2017; KOCOT; OLSZEWSKA, 2017).

Figura 5 - Diferentes estágios da formação de biofilme bacteriano.



Fonte: Menoita, 2012, adaptado pelo autor.

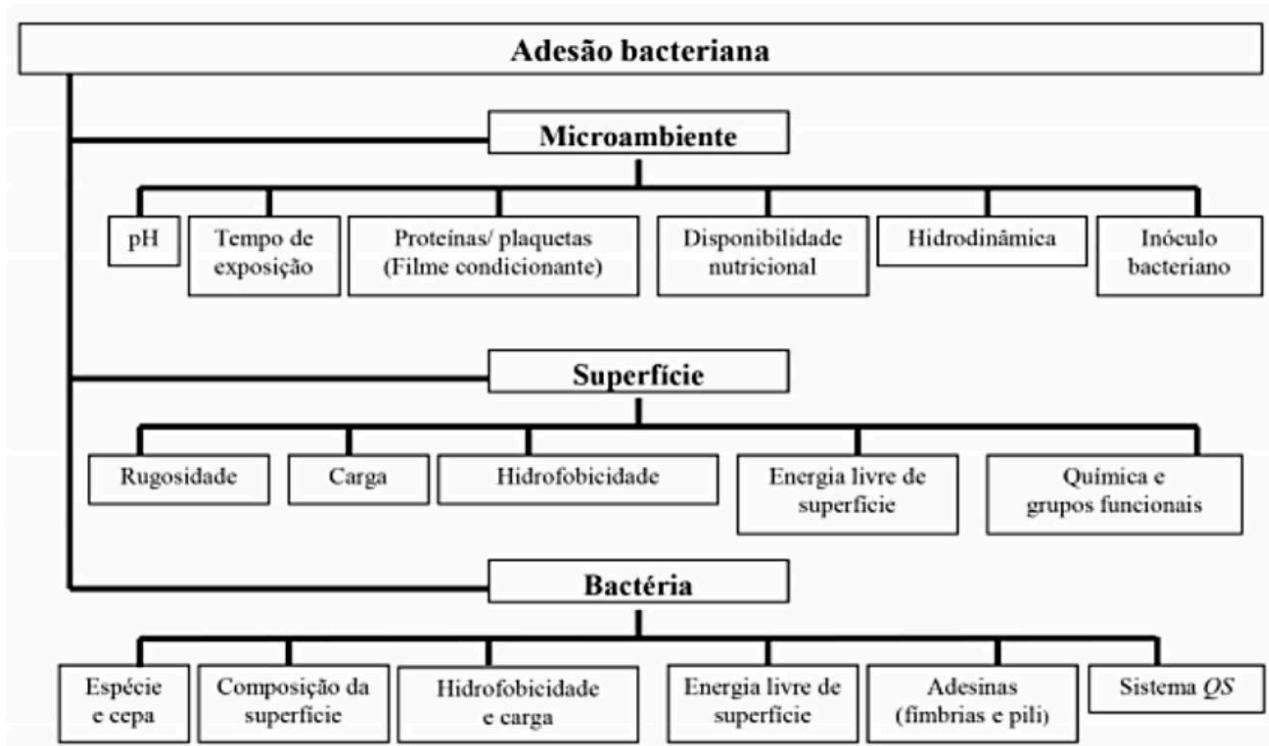
A adesão primária ou reversível é considerado um dos processos mais complexos da produção de biofilme, pois envolve forças físico-químicas não específicas quando se trata de superfícies abióticas, e quando voltadas às superfícies bióticas ocorrem interações do tipo específicas quando há presença de moléculas receptoras pela interface da bactéria. A princípio, as bactérias planctônicas que estão a uma certa distância (50 nm) das superfícies começam a interagir por força da gravidade, forças eletrostáticas, e de Van Der Waals. Quando se chega a certa distância, a interação depende muito das somas dessas forças. As interações hidrofóbicas, têm revelado serem mais efetivas na adesão, quando se tratando de interação não específica, pois quando se fala em relação específica as ligações por adesinas têm realizado esta função (JÚNIOR, 2015; KOCOT; OLSZEWSKA, 2017; TRENTIN et al., 2011).

A adesão secundária ou irreversível se dá pela fixação total das bactérias, e a partir deste momento os organismos aderidos começam a liberar EPS, matriz composta por exopolissacarídeos, ácidos nucleicos, proteínas, lipídeos, entre outros. Após a liberação da EPS, segue a fase em que ocorre o amadurecimento do biofilme, no qual se encontram várias microcolônias, formando uma estrutura parecida com a de um cogumelo ou uma tulipa, com vários canais de água, conferindo assim um tipo de sistema circulatório tanto para a própria água e distribuição de nutrientes, quanto para liberação das toxinas produzidas. De acordo com alguns estudos, a EPS faz parte de mais de 80% da matéria seca, levando assim as bactérias a fazerem parte de apenas 20% do biofilme. Quando as condições ambientais não estão mais favoráveis ou por indução molecular, ocorre a última fase da formação de biofilme bacteriano, que seria o desprendimento (sloughing off, erosão, ataque por predadores, abrasão) ou de uma parte da matriz com organismos ou de formas planctônicas, para uma nova colonização (KOCOT; OLSZEWSKA, 2017; MENOITA et al., 2012; RASAMIRAVAKA et al., 2015; TRENTIN; MACEDO, 2013).

Estudos levantam uma questão muito importante para a formação do biofilme, que é a presença do Quorum sense (QS), um mecanismo de comunicação célula-célula bacteriana conforme a densidade da população através da liberação de moléculas sinalizadoras, chamadas de autoindutoras (AIs). Onde, este mecanismo é responsável por várias atividades da comunidade, por exemplo, a própria formação do biofilme e liberação de EPS, a virulência, transferência e expressão de genes contra antimicrobianos, entre outras. Com isso, observa-se que além do mecanismo de QS, para o biofilme ser formado há outros fatores que

participam desta formação, tais fatores estão ilustrados na Figura 6 (MA et al., 2017; RASAMIRAVAKA et al., 2015; SONG et al., 2017; ZHU et al., 2016).

Figura 6 - Fatores que influenciam a formação de biofilme bacteriano.



Fonte: Trentin, 2013.

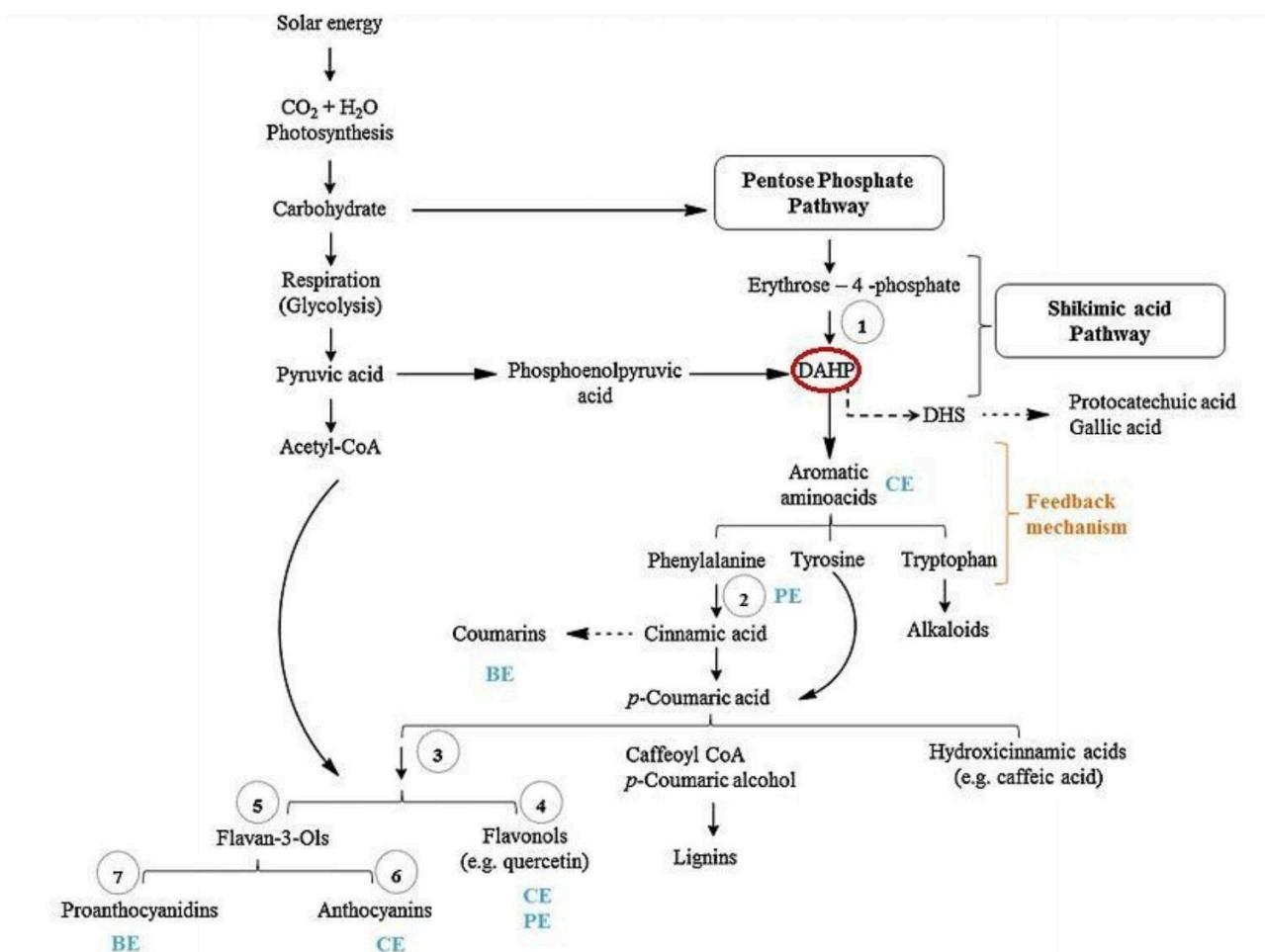
A capacidade das bactérias de formar biofilme levou a necessidade de estudos que avaliem compostos em potencial para inibir a formação destes biofilmes. Uma alternativa têm sido o estudo de compostos naturais com propriedades que inibem ou minimizam a formação dessas comunidades bacterianas, principalmente devido à alta resistência desses organismos às drogas existentes e até ao sistema imune humano, o que tem causado grandes impactos tanto na medicina quanto na saúde pública (CHUNG; TOH, 2014; RABIN et al., 2015; SILVA et al., 2014). Em resposta às pressões ecológicas como herbivoria, fermentos e radiações UV as plantas produzem compostos fenólicos, referentes ao seu metabolismo secundário, que garantem resistência aos estresses ambientais. Estes fitoquímicos são amplamente encontrados nas plantas e estão presentes na maioria dos tecidos vegetais (DE LA ROSA et al., 2019). Embora não sejam considerados nutrientes, quando ingeridos, estes compostos possuem propriedades bioativas que fornecem efeitos benéficos à saúde humana como potentes antioxidantes, entre outras propriedades (SANTOS et al., 2018).

2.6.Compostos fenólicos: caracterização e aplicabilidade

A estrutura química básica dos compostos fenólicos compreende em pelo menos um anel aromático ligado a um ou mais grupos hidroxila, estes são principalmente sintetizados a partir do aminoácido fenilalanina, que é convertido em ácido cinâmico (KULBAT, 2016). Em sua estrutura, as posições de suas hidroxilas e seus átomos de carbono são as principais características que diferenciam os tipos existentes de compostos fenólicos. Em reflexo a isso, 8 mil são os tipos de compostos fenólicos já conhecidos atuantes no metabolismo de defesa de diversas plantas. Dentre eles, o mais simples é a classe do ácido carbólico, usualmente conhecidos como classe de fenol. Estes compostos podem ainda ser classificados como fenóis simples ou polifenóis, com base nas unidades de fenol encontrados em suas moléculas (ALU'DATT et al., 2017).

Para a biossíntese de compostos fenólicos destaca-se duas rotas metabólicas principais: a via do ácido mevalônico, a qual é menos significativa e, principalmente a via do ácido chiquímico, um composto intermediário em vias bioquímicas de plantas e microrganismos. Além disso, a via do ácido chiquímico está relacionado com a produção de alguns metabólitos secundários (alcaloides, terpenos e fenilpropanoides) provenientes do metabolismo primário de plantas. Na via do ácido chiquímico, (Figura 7) uma molécula de ácido fosfoenolpirúvico (PEP), proveniente da glicólise, é uma molécula de eritrose-4-fosfato, derivada do fosfato da via das pentoses, são combinadas resultando na formação de um açúcar de sete carbonos denominado 3-desoxiarabinohexulonato-7-fosfato (DAHP), em uma reação catalisada pela enzima DAHP sintase. Em seguida, a molécula é reduzida para formar shikimato, que é um ramo cítrico para formação de compostos fenólicos. A partir disso, ocorre a formação de ácidos fenólicos como o ácido protocatecuico e ácido elágico e fenóis simples possuindo apenas um grupo carboxila, servindo como precursores de outros compostos mais complexos, ou leva à formação de aminoácidos aromáticos, fenilalanina, tirosina e triptofano, dando início a via fenilpropanóide a partir deste ponto (CZELUSNIAK et al., 2012; DIAS-SOUZA et al., 2016).

Figura 7 - Biossíntese de compostos fenólicos. CO₂ - dióxido de carbono; H₂O - água; Acetyl-CoA - Acetil Coenzima A; DAHP - fosfato de 3-desoxi-O-arabino-heptulosonato; DHS - 3-desidroquinato; BE - elicitação biológica; CE - elicitação química; Elicitação física PE; As enzimas envolvidas na biossíntese são marcadas com formas pretas tracejadas arredondadas: 1-DAHP sintase (3-desoxi-O-arabinoheptulosonato fosfato sintase); 2-PAL (fenilalanina amônia-liase); 3-CHS (Chalcones sintase), CHI (Chalcones isomerase), F3H (Flavanona-3-hidroxilase); 4-FLS (Flavonol sintase); 5-LAR (leucoantocianidina redutase); 6-LDOX (leucoantocianidina dioxigenase).



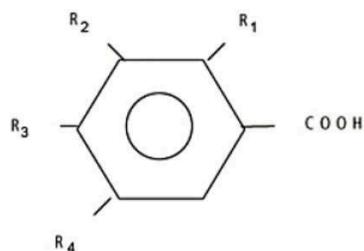
Fonte: Dias-Souza *et al.*, 2016, adaptado pelo autor.

A partir de sua estrutura química, os compostos fenólicos podem ser divididos em três grupos principais: os ácidos fenólicos, flavonoides e taninos (GAN *et al.*, 2019). Os ácidos fenólicos são importantes compostos fenólicos encontrados em diversas frutas, verduras, cereais, legumes e bebidas, estando envolvidos principalmente com a pigmentação, crescimento, reprodução e resistência a patógenos em plantas. Ademais, estes compostos caracterizam-se por terem um anel benzênico, um grupo funcional carboxila e um ou mais grupamentos de

hidroxila e/ou metoxila em sua molécula, ver Figura 8 (VINAYAGAM; JAYACHANDRAN; XU, 2016).

Esses são divididos em duas classes: hidroxibenzoicos, menos abundantes nos vegetais consumidos por humanos e hidroxicinâmicos, encontrados em diversos alimentos de origem vegetal (DE OLIVEIRA; BASTOS, 2011). Os ácidos fenólicos detêm fortes atividades aplicáveis na área farmacológica, como importantes antioxidantes (ZARATE et al., 2018); anti-inflamatórios (LIU et al., 2018); anti-carcinogênicos (ROSA; SILVA, 2016); estimulantes da imunidade (KILANI-JAZIRI et al., 2017) e propriedades anti-diabéticas (LI et al., 2019; VINAYAGAM; JAYACHANDRAN; XU, 2016).

Figura 8 - Ácido Fenólico, estrutura dos ácidos benzóicos. R₁ = OH → Ácido Salicílico; R₁ = R₄ = OH → Ácido Gentísico; R₃ = OH → Ácido p-hidroxibenzoico; R₂ = R₃ = OH → Ácido Protocatequínico; R₂ = OCH₃; R₃ = OH → Ácido Vanílico; R₂ = R₃ = R₄ = OH → Ácido Gálico; R₂ = R₄ = OCH₃; R₃ = OH → Ácido Siríngico.

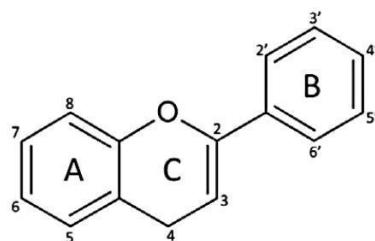


Fonte: Soares, 2002.

Os flavonoides são os compostos fenólicos mais abundantes e bioativos, principalmente encontrados em frutas e vegetais, facilmente reconhecidos como pigmentos de flores, na maioria dos casos. Eles possuem um esqueleto de fenilbenzopirano: dois anéis de fenil (A e B) unidos por um anel de pirano heterocíclico (anel C) como mostrado na Figura 9 (DE LA ROSA et al., 2019). Eles detêm diversos efeitos bioquímicos favoráveis à saúde humana, principalmente por suas propriedades antioxidantes (NILE et al., 2018) anti-inflamatórias (WEI et al., 2018), anti-mutagênicas (OKUNO; MARUMOTO; MIYAZAWA, 2019) e anticarcinogênicas (RAFFA et al., 2017), juntamente com a capacidade de modular as principais funções enzimáticas nas células (MIRON et al., 2017). Em resposta a essas

propriedades, tornam-se indispensáveis em muitas aplicações nutracêuticas, farmacêuticas, medicinais e cosméticas (PANCHE; DIWAN; CHANDRA, 2016).

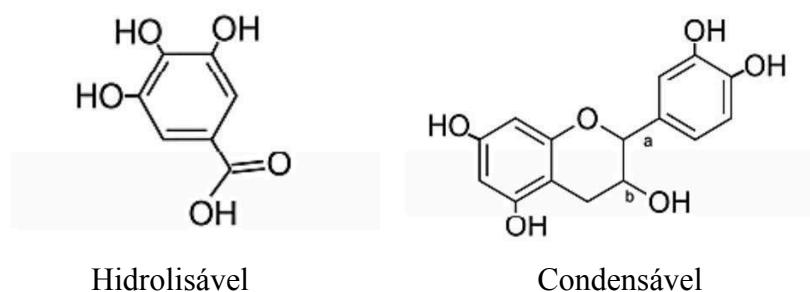
Figura 9 - Estrutura básica dos flavonoides, esqueleto de fenilbenzopirano.



Fonte: De La Rosa, *et al.*, 2019.

Os taninos são estruturas fenólicas encontradas abundantemente em cascas, como madeira, e em menor quantidade em folhas e frutos de espécies vegetais variadas. Esse tipo de composto tem papel na proteção de plantas sob estresses bióticos, como herbívia e abióticos, como a luz UV e seca. Eles podem ainda ser classificados em dois grupos: taninos hidrolisáveis e condensados (SHIRMOHAMMADLI; EFHAMISISI; PIZZI, 2018). Os taninos hidrolisáveis são misturas de fenóis simples e tem a característica de poderem ser hidrolisados por ácidos/bases fracos produzindo carboidratos e ácidos fenólicos. Os condensados são os polifenóis mais abundantes em plantas e não são hidrolisados facilmente (SMERIGLIO et al., 2017). Os taninos possuem propriedades como antioxidantes (ABU ZARIN et al., 2016); antitumoral (COŞARCĂ et al., 2019); antifúngicas (ZHU et al., 2019) e antibacterianas (DAING et al., 2017) tendo papel importante na saúde humana (CHANG et al., 2019).

Figura 10 - Estrutura do Tanino hidrolisável (ácido gálico) e condensável (proantocianidina).



Hidrolisável

Condensável

Fonte: Barrett; Farhadi; Smith, 2018.

Como mencionado, os compostos fenólicos são fitoquímicos com diversas propriedades de defesa contra ataques de organismos, dentre eles, garantem proteção contra patógenos microbianos, nesse caso bactérias, que provocam infecções em suas estruturas vegetais. Na saúde humana, estas substâncias desempenham um papel importante na resistência contra vários microrganismos, devido ao seu papel essencial nas infecções (WALSH et al., 2019b). Como mecanismos de atividades antibacteriana estudos revelam que os fenólicos interagem com proteínas bacterianas e estruturas de parede celular podendo causar danos nas membranas plasmáticas, reduzindo a fluidez da membrana, inibindo a síntese de ácidos nucleicos, a síntese da parede celular ou do metabolismo energético (SLOBODNÍKOVÁ et al., 2016).

Além da atividade destrutiva das bactérias, pesquisas revelam o potencial dos compostos fenólicos na supressão do biofilme bacteriano, afetando mecanismos reguladores destes microrganismos. Microrganismos agregados, como a estrutura do biofilme, são mais resistentes à ação de antibióticos que os que vivem isolados, tornando mais difícil o sucesso dos tratamentos às doenças relacionadas a este tipo de bactéria (UGURLU et al., 2016). Vários mecanismos foram propostos para explicar a resistência do biofilme aos medicamentos, sendo eles: a fraca penetração e difusão das drogas antimicrobianas através da matriz polimérica extracelular; indução da resposta geral ao estresse; diminuição do crescimento e metabolismo; forte expressão de bombas de efluxo e enzimas capazes de degradar moléculas de antimicrobianos; ativação do sistema de detecção de quórum e alteração de perfis de proteínas na membrana externa (KOUIDHI; AL QURASHI; CHAIEB, 2015).

Nos últimos anos, observou-se um aumento de doenças infecciosas por biofilme bacteriano, principalmente por pacientes com dispositivos médicos implantados, como dispositivos de assistência ventricular, válvulas cardíacas mecânicas e próteses articulares e de mama (DEL POZO, 2018). A formação de biofilme está associada à vários problemas à saúde, como graves infecções no trato respiratório, pneumonia (DA COSTA LIMA et al., 2017) diarreia (CULLER et al., 2018) e formação de placa dental (MARSH; ZAURA, 2017). Os estudos com compostos fenólicos se tornaram necessários devido às propriedades antimicrobianas

desses fitoquímicos e seu potencial como minimizadores da formação de biofilme (LOPES et al., 2017).

Esses compostos podem interferir na comunicação célula-célula das bactérias inibindo o Quórum sense e outros sistemas regulatórios globais, causando efeito sobre o crescimento bacteriano. Exemplos de compostos que apresentam essas propriedades podem ser o galato de metila (HOSSAIN et al., 2017) galato de epigalocatequina e ácidos fenólicos (MANDAL; DIAS; FRANCO, 2017). Outra característica é que estudos realizados por Gyawali e Ibrahim, (2014) afirmam que o grupo hidroxila (-OH) em compostos fenólicos pode causar inibição bacteriana e que a presença de ligações duplas (número e posição) podem auxiliar na eficácia antimicrobiana (MACÉ; TRUELSTRUP HANSEN; RUPASINGHE, 2017).

3 OBJETIVOS

3.1.Objetivos Gerais

Identificar o potencial antimicrobiano e antibiofilme dos compostos fenólicos em *K. pneumoniae* MDR.

3.2.Objetivos específicos

- a) Avaliar a formação de biofilme das cepas coletadas em diferentes meios de cultura;
- b) Identificar o potencial antimicrobiano e antibiofilme dos compostos fenólicos contra as cepas formadoras de biofilme;
- c) Investigar o perfil epidemiológico dos isolados de *K. pneumoniae* MDR;
- d) Investigar genes de virulência relacionados com o biofilme.

4. REFERÊNCIAS

- ABU ZARIN, M. et al. Antioxidant, antimicrobial and cytotoxic potential of condensed tannins from *Leucaena leucocephala* hybrid-Rendang. **Food Science and Human Wellness**, v. 5, n. 2, p. 65–75, 2016.
- AHMED, A. J. A.; ALAA, H. A. A. Virulence factors and antibiotic susceptibility patterns of multidrug resistance *Klebsiella pneumoniae* isolated from different clinical infections. **African Journal of Microbiology Research**, v. 10, n. 22, p. 829–843, 2016.
- ALU'DATT, M. H. et al. A review of phenolic compounds in oil-bearing plants: Distribution, identification and occurrence of phenolic compounds. **Food Chemistry**, v. 218, p. 99–106, 2017.
- ARRUDA, C. J. M. DE et al. Revista Saúde em Foco –Bibliographic review of Beta-lactam antibiotics. **Revista Saúde em Foco**, p. 982–995, 2019.
- BARRETT, A. H.; FARHADI, N. F.; SMITH, T. J. Slowing starch digestion and inhibiting digestive enzyme activity using plant flavanols/tannins— A review of efficacy and mechanisms. **LWT - Food Science and Technology**, v. 87, p. 394–399, 2018.
- BILAL, M. et al. International Journal of Biological Macromolecules Macromolecular agents with antimicrobial potentialities□: A drive to combat antimicrobial resistance. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 103, p. 554–574, 2017.
- BOEHMER, T. et al. Phenotypic characterization and whole genome analysis of extended-spectrum betalactamase-producing bacteria isolated from dogs in Germany. **PLoS ONE**, v. 13, n. 10, p. 1–17, 2018.
- BONOMO, R. A. β -Lactamases: A focus on current challenges. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, v. 7, n. 1, p. 1–16, 2017.
- BRISSE, S. et al. Research note: Development of a rapid method for *Klebsiella pneumoniae* phylogenetic groups an analysis of 420 clinical isolates. **October**, v. 10, n. 10, p. 942–945, 2004.
- BRISSE, S.; PASSET, V.; GRIMONT, P. A. D. Description of *Klebsiella quasipneumoniae* sp. nov., Isolated from human infections, With two subspecies, *Klebsiella quasipneumoniae* subsp. *quasipneumoniae* subsp. nov. and *Klebsiella quasipneumoniae* subsp. *similipneumoniae* subsp. nov., And demonstration that *Klebsiella singaporense* is a junior heterotypic synonym of *Klebsiella variicola*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 64, p. 3146–3152, 2014.
- BUSH, K.; BRADFORD, P. A. Interplay between β -lactamases and new β -lactamase inhibitors. **Nature Reviews Microbiology**, v. 17, n. 5, p. 295–306, 2019.

CANDIDATE, S. G. P. D.; TABATABAEI, M. Microbial Pathogenesis Comparison of biofilm formation and antibiotic resistance pattern of *Pseudomonas aeruginosa* in human and environmental isolates. **Microbial Pathogenesis**, v. 109, p. 94–98, 2017.

CATALÁN-NÁJERA, J. C.; GARZA-RAMOS, U.; BARRIOS-CAMACHO, H. Hypervirulence and hypermucoviscosity: Two different but complementary *Klebsiella* spp. phenotypes? **Virulence**, v. 8, n. 7, p. 1111–1123, 2017.

CHANG, Z. et al. A Comprehensive Review of the Structure Elucidation of Tannins from Terminalia Linn. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2019, 2019.

CHAVES, T. P. Variação sazonal na produção de metabólitos secundários e na atividade antimicrobiana de espécies vegetais do semiárido brasileiro. p. 0–77, 2012.

CHUNG, P. Y.; TOH, Y. S. Anti-biofilm agents□: recent breakthrough against multi-drug resistant *Staphylococcus aureus*. **Pathogens and Disease**, v. 0, p. 1–9, 2014.

CHUNG THE, H. et al. A high-resolution genomic analysis of multidrug-resistant hospital outbreaks of *Klebsiella pneumoniae*. **EMBO Molecular Medicine**, v. 7, n. 3, p. 227–239, 2015.

CLEGG, S.; MURPHY, C. N. Epidemiology and Virulence of *Klebsiella pneumoniae*. **Microbiology Spectrum**, v. 4, n. 1, 2016.

COŞARCĂ, S. L. et al. Spruce and beech bark aqueous extracts: source of polyphenols, tannins and antioxidants correlated to in vitro antitumor potential on two different cell lines. **Wood Science and Technology**, v. 53, n. 2, p. 313–333, 2019.

CUI, X.; ZHANG, H.; DU, H. Carbapenemases in Enterobacteriaceae: Detection and Antimicrobial Therapy. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, n. August, p. 1–12, 2019.

CULLER, H. F. et al. Role of SdiA on biofilm formation by atypical enteropathogenic *Escherichia coli*. **Genes**, v. 9, n. 5, 2018.

CZELUSNIAK, K. E. et al. Farmacobotânica, fitoquímica e farmacologia do Guaco: Revisão considerando *Mikania glomerata* Sprengel e *Mikania laevigata* Schulyz Bip. ex Baker. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v. 14, n. 2, p. 400–409, 2012.

DA COSTA LIMA, J. L. et al. Analysis of biofilm production by clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* from patients with ventilator-Associated pneumonia. **Revista Brasileira de Terapia Intensiva**, v. 29, n. 3, p. 310–316, 2017.

DAING, M. I. et al. Antioxidant and antibacterial potential of condensed tannins containing tree leaves extract. **Veterinary Practitioner**, v. 18, n. 1, p. 118–121, 2017.

DE LA ROSA, L. A. et al. Phenolic Compounds. [s.l.] Elsevier Inc., 2019.

DE OLIVEIRA, D. M.; BASTOS, D. H. M. Biodisponibilidade de Ácidos fenólicos. **Quimica Nova**, v. 34, n. 6, p. 1051–1056, 2011.

- DEL POZO, J. L. Biofilm-related disease. **Expert Review of Anti-Infective Therapy**, v. 16, n. 1, p. 51–65, 2018.
- DIAS-SOUZA, M. V et al. ScienceDirect Antibiofilm activity of cashew juice pulp against *Staphylococcus aureus*, high performance liquid chromatography / diode array detection and gas chromatography-mass spectrometry analyses, and interference on antimicrobial drugs. **Journal of Food and Drug Analysis**, n. November, p. 1–8, 2016.
- DRANCOURT, M. et al. Drancourt- Int J Systematic and Evol Micro 2001. p. 925–932, 2001.
- FU, L. et al. Frequency of virulence factors in high biofilm formation blaKPC-2 producing *Klebsiella pneumoniae* strains from hospitals. **Microbial Pathogenesis**, v. 116, n. January, p. 168–172, 2018.
- GAN, R.-Y. et al. Bioactive compounds and beneficial functions of sprouted grains. [s.l.]. Elsevier Inc., 2019.
- GOMES, D. R. M.; CASALINI, C. C. Características microbiológicas de *Klebsiella pneumoniae* isoladas no meio ambiente hospitalar: uma revisão. **Revista Saúde Integrada**, v. 11, n. 2018, p. 71–84, 2018.
- GYAWALI, R.; IBRAHIM, S. A. Natural products as antimicrobial agents. **Food Control**, v. 46, p. 412–429, 2014.
- HENNEQUIN, C.; ROBIN, F. Correlation between antimicrobial resistance and virulence in *Klebsiella pneumoniae*. **European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v. 35, n. 3, p. 333–341, 2016.
- HERNÁNDEZ ZARATE, M. S. et al. Flavonoids, phenolic content, and antioxidant activity of propolis from various areas of Guanajuato, Mexico. **Food Science and Technology**, v. 38, n. 2, p. 210–215, 2018.
- HOLT, K. E. et al. Genomic analysis of diversity, population structure, virulence, and antimicrobial resistance in *Klebsiella pneumoniae*, an urgent threat to public health. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 112, n. 27, p. E3574–E3581, 2015.
- HOSSAIN, M. A. et al. Impact of phenolic compounds in the acyl homoserine lactone-mediated quorum sensing regulatory pathways. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 1–16, 2017.
- HSU, C. R. et al. Identification of a capsular variant and characterization of capsular acetylation in *Klebsiella pneumoniae* PLA-associated type K57. **Scientific Reports**, v. 6, n. August, p. 1–13, 2016.
- HUSSAIN, M. S.; OH, D. H. Substratum attachment location and biofilm formation by *Bacillus cereus* strains isolated from different sources: Effect on total biomass production and sporulation in different growth conditions. **Food Control**, v. 77, p. 270–280, 2017.
- JAMAL, M. et al. Bacterial biofilm and associated infections. **Journal of the Chinese Medical Association**, v. 81, n. 1, p. 7–11, 2018.

JUNIOR, C. D. F. Caracterização de cepas de Enterobacteriaceae resistentes a carbapenens isoladas no Distrito Federal. UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA, p. 1–87, 2014.

JÚNIOR, J. F. Q. F. Adesão e formação de biofilmes em superfícies de processamento de alimentos funcionalizadas com nanopartículas. p. 0–49, 2015.

KILANI-JAZIRI, S. et al. Immunomodulatory and cellular anti-oxidant activities of caffeic, ferulic, and p-coumaric phenolic acids: a structure–activity relationship study. **Drug and Chemical Toxicology**, v. 40, n. 4, p. 416–424, 2017.

KOCOT, A. M.; OLSZEWSKA, M. A. LWT - Food Science and Technology Biofilm formation and microscopic analysis of biofilms formed by *Listeria monocytogenes* in a food processing context. **LWT - Food Science and Technology**, v. 84, p. 47–57, 2017.

KOUIDHI, B.; AL QURASHI, Y. M. A.; CHAIEB, K. Drug resistance of bacterial dental biofilm and the potential use of natural compounds as alternatives for prevention and treatment. **Microbial Pathogenesis**, v. 80, p. 39–49, 2015.

KULBAT, K. The role of phenolic compounds in plant resistance. **Biotechnol Food Sci**, v. 80, n. 2, p. 97–108, 2016.

LEE, C. R. et al. Antimicrobial resistance of hypervirulent *Klebsiella pneumoniae*: Epidemiology, hypervirulence-associated determinants, and resistance mechanisms. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 7, n. NOV, 2017.

LI, B. et al. Molecular pathogenesis of *Klebsiella pneumoniae*. **Future Microbiology**, v. 9, n. 9, p. 1071–1081, 2014.

LI, Y. et al. Application of MALDI-TOF MS to rapid identification of anaerobic bacteria. **BMC Infectious Diseases**, v. 19, n. 1, p. 1–11, 2019.

LIMOLI, D. H.; JONES, C. J.; WOZNIAK, D. J. Bacterial Extracellular Polysaccharides in Biofilm Formation and Function. **Microbiology Spectrum**, v. 3, n. 3, p. 223–247, 2015.

LIU, H. et al. Anti-inflammatory activities and potential mechanisms of phenolic acids isolated from *Salvia miltiorrhiza* f. *alba* roots in THP-1 macrophages. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 222, p. 201–207, 2018.

LOPES, L. A. A. et al. Inhibitory effects of flavonoids on biofilm formation by *Staphylococcus aureus* that overexpresses efflux protein genes. **Microbial Pathogenesis**, v. 107, p. 193–197, 2017.

LS, R.; NJA, S. Anticancer Properties of Phenolic Acids in Colon Cancer – A Review. **Journal of Nutrition & Food Sciences**, v. 06, n. 02, 2016.

MA, R. et al. International Journal of Medical Microbiology AI-2 quorum sensing negatively regulates rbf expression and biofilm formation in *Staphylococcus aureus*. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 307, n. 4–5, p. 257–267, 2017.

- MACÉ, S.; TRUELSTRUP HANSEN, L.; RUPASINGHE, H. P. V. Anti-Bacterial Activity of Phenolic Compounds against *Streptococcus pyogenes*. **Medicines**, v. 4, n. 2, p. 25, 2017.
- MAMONE, L. et al. Journal of Photochemistry & Photobiology , B: Biology Photodynamic inactivation of planktonic and bio film growing bacteria mediated by a meso -substituted porphyrin bearing four basic amino groups. **Journal of Photochemistry & Photobiology, B: Biology**, v. 161, p. 222–229, 2016.
- MANDAL, S. M.; DIAS, R. O.; FRANCO, O. L. Phenolic Compounds in Antimicrobial Therapy. **Journal of Medicinal Food**, v. 20, n. 10, p. 1031–1038, 2017.
- MARSH, P. D.; ZAURA, E. Dental biofilm: ecological interactions in health and disease. **Journal of Clinical Periodontology**, v. 44, p. S12–S22, 2017.
- MARTIN, R. M.; BACHMAN, M. A. Colonization, infection, and the accessory genome of *Klebsiella pneumoniae*. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 8, n. JAN, p. 1–15, 2018.
- MARTÍNEZ, J. et al. How are gene sequence analyses modifying bacterial taxonomy? The case of *Klebsiella*. **International Microbiology**, v. 7, n. 4, p. 261–268, 2004.
- MELO, R. DE C. A. Isolados clínicos de *Klebsiella pneumoniae* produtores e não produtores de KPC: Relação com a presença dos genes de virulência fim H, mrk D e irp 2. Universidade Federal de Pernambuco, p. 1–90, 2013.
- MENOITA, E. et al. Biofilmes: conhecer a entidade. **Journal of Aging and Innovation**, v. 1, p. 23–32, 2012.
- MIRANDA, I. F. et al. *Klebsiella pneumoniae* producer of carbapenemase of the kpc type: worldwide dissemination and current aspect in Brazil. **Brazilian Journal of Surgery and Clinical Research**, v. 25, n. 2, p. 113–119, 2018.
- MIRON, A. et al. Flavonoids as modulators of metabolic enzymes and drug transporters. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1398, n. 1, p. 152–167, 2017.
- NAAS, T. et al. Beta-lactamase database (BLDB)—structure and function. **Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry**, v. 32, n. 1, p. 917–919, 2017.
- NILE, S. H. et al. Antioxidant, anti-inflammatory, and enzyme inhibitory activity of natural plant flavonoids and their synthesized derivatives. **Journal of Biochemical and Molecular Toxicology**, v. 32, n. 1, 2018.
- OKUNO, Y.; MARUMOTO, S.; MIYAZAWA, M. Antimutagenic activity of flavonoids from Sozoku. **Natural Product Research**, v. 33, n. 6, p. 862–865, 2019.
- ØRSKOV, I.; ØRSKOV, F. 4 Serotyping of *Klebsiella*. **Methods in Microbiology**, v. 14, n. C, p. 143–164, 1984.
- PACZOSA, M. K.; MECSAS, J. *Klebsiella pneumoniae*: Going on the Offense with a Strong Defense. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 80, n. 3, p. 629–661, 2016.

- PANCHE, A. N.; DIWAN, A. D.; CHANDRA, S. R. Flavonoids: An overview. **Journal of Nutritional Science**, v. 5, 2016.
- PATEL, S. S. et al. Isolation and Identification of Klebsiella pneumoniae from Sheep-Case Report. **International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences**, v. 6, n. 5, p. 331–334, 2017.
- PODSCHUN, R.; ULLMANN, U. Klebsiella spp . as Nosocomial Pathogens□: Epidemiology, Taxonomy , Typing Methods , and Pathogenicity Factors Klebsiella spp . as Nosocomial Pathogens□: Epidemiology , Taxonomy , Typing Methods , and Pathogenicity Factors. **Clinical microbiology reviews**, v. 11, n. 4, p. 589–603, 1998.
- RABIN, N. et al. Agents that inhibit bacterial biofilm formation. **Future Medicinal Chemistry**, v. 7, n. 5, p. 647–671, 2015.
- RAFFA, D. et al. Recent discoveries of anticancer flavonoids. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 142, p. 213–228, 2017.
- RASAMIRAVAKA, T. et al. The Formation of Biofilms by Pseudomonas aeruginosa□: A Review of the Natural and Synthetic Compounds Interfering with Control Mechanisms. v. 2015, 2015.
- REGIEL-FUTYRA, A. et al. Bioinorganic antimicrobial strategies in the resistance era. **Coordination Chemistry Reviews**, 2017.
- ROSENBLUETH, M. et al. Klebsiella variicola, A Novel Species with Clinical and Plant-Associated Isolates. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 27, n. 1, p. 27–35, 2004.
- SAKOULAS, G.; GERIAK, M.; NIZET, V. Is a reported penicillin allergy sufficient grounds to forgo the multidimensional antimicrobial benefits of β-lactam antibiotics? **Clinical Infectious Diseases**, v. 68, n. 1, p. 157–164, 2019.
- SANTOS, J. A. S. et al. Estudo do potencial antioxidante da Anacardium occidentales L. e determinação de seus compostos fenólicos. **Diversitas Journal**, v. 3, n. 2, p. 455, 2018.
- SHIRMOHAMMADLI, Y.; EFHAMISISI, D.; PIZZI, A. Tannins as a sustainable raw material for green chemistry: A review. **Industrial Crops and Products**, v. 126, n. October, p. 316–332, 2018.
- SILVA, L. N. et al. Anti-infective effects of Brazilian Caatinga plants against pathogenic bacterial biofilm formation. **Pharmaceutical Biology**, p. 1–5, 2014.
- SILVA, M. D. Estudo Farmacobotânico de Três Espécies Medicinais da Caatinga em Pernambuco. p. 0–74, 2008.
- SLOBODNÍKOVÁ, L. et al. Antibiofilm activity of plant polyphenols. **Molecules**, v. 21, n. 12, p. 1–15, 2016.

SMERIGLIO, A. et al. Proanthocyanidins and hydrolysable tannins: occurrence, dietary intake and pharmacological effects. **British Journal of Pharmacology**, v. 174, n. 11, p. 1244–1262, 2017.

SOARES, S. E. Ácidos Fenólicos Como Antioxidantes. **Revista de Nutrição**, v. 15, n. 1, p. 71–81, 2002.

SONG, X. et al. A Review of Natural Products with Anti-Biofilm Activity. **Current Organic Chemistry**, v. 22, n. 8, p. 789–817, 2017.

SOUZA, A. T. H. I. et al. Perfil de resistência antimicrobiana de Klebsiella pneumoniae isoladas de animais domésticos e silvestres. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 71, n. 2, p. 584–593, 2019.

SYLVAIN, F.; GRIMONT, P. The Genus Klebsiella. **Prokaryotes**, v. 6, p. 159–196, 2006.

TRENTIN, D. D. S. et al. Potential of medicinal plants from the Brazilian semi-arid region (Caatinga) against *Staphylococcus epidermidis* planktonic and biofilm lifestyles. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 137, n. 1, p. 327–335, 2011.

TRENTIN, D. DA S.; MACEDO, A. J. Biofilmes bacterianos patogênicos: aspectos gerais, importância clínica e estratégias de combate. **ResearchGate**, n. October, 2013.

UGURLU, A. et al. Phenolic compounds affect production of pyocyanin, swarming motility and biofilm formation of *Pseudomonas aeruginosa*. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 6, n. 8, p. 698–701, 2016.

UR RAHMAN, S. et al. The Growing Genetic and Functional Diversity of Extended Spectrum Beta-Lactamases. **BioMed Research International**, v. 2018, 2018.

VAN LEUWENHOEK, A. [The study of dental plaque by Antoni van Leeuwenhoek in 1683. **Nederlands tijdschrift voor tandheelkunde**, v. 90, n. 9, p. 421–4, set. 1983.

VINAYAGAM, R.; JAYACHANDRAN, M.; XU, B. Antidiabetic Effects of Simple Phenolic Acids: A Comprehensive Review. **Phytotherapy Research**, v. 30, n. 2, p. 184–199, 2016.

WALSH, D. J. et al. Antimicrobial Activity of Naturally Occurring Phenols and Derivatives Against Biofilm and Planktonic Bacteria. **Frontiers in Chemistry**, v. 7, 2019a.

WALSH, D. J. et al. Antimicrobial Activity of Naturally Occurring Phenols and Derivatives Against Biofilm and Planktonic Bacteria. **Frontiers in Chemistry**, v. 7, n. October, p. 1–13, 2019b.

WANNMACHER, L. Uso indiscriminado de antibióticos e resistência microbiana: Uma guerra perdida? In: Uso racional de medicamentos. [s.l: s.n.]. v. 1, n. 4p. 1–6.

WEI, M. et al. Urinary metabolomics study on the anti-inflammation effects of flavonoids obtained from Glycyrrhiza. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 1086, n. October 2017, p. 1–10, 2018.

WU, H. et al. Strategies for combating bacterial biofilm infections. **International Journal of Oral Science**, v. 7, n. July, p. 1–7, 2015.

ZHENG, J. X. et al. Biofilm formation in Klebsiella pneumoniae bacteremia strains was found to be associated with CC23 and the presence of wcaG. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 8, n. FEB, 2018.

ZHU, C. et al. Antifungal activity and mechanism of action of tannic acid against Penicillium digitatum. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 107, n. March, p. 46–50, 2019.

ZHU, J. et al. International Journal of Food Microbiology Quorum sensing signals affect spoilage of refrigerated large yellow croaker (Pseudosciaena crocea) by Shewanella baltica. **International Journal of Food Microbiology**, v. 217, p. 146–155, 2016.

5. ARTIGO

ANTIBIOFILM EFFECT OF PHENOLIC COMPOUNDS ON MULTIDRUG RESISTANT *Klebsiella pneumoniae* ISOLATES

Affiliations

Rafael Artur de Queiroz Cavalcanti de Sá^a(Sá, R. A. Q. C.), r.artu.queiroz@gmail.com

Bárbara de Azevedo Ramos^a(Ramos, B.A.), babi.a.ramos@gmail.com

Fernanda Ferreira de Caldas Padilha^a(Padilha, F. F. C.), nandapadilha161@gmail.com

Tainara Fernandes Dantas^d(Dantas, T.F.), tainarafd85@gmail.com

Bruno Oliveira de Veraz^b(Veras, B. O.), brunooveras@hotmail.com

Alexsandra Maria Lima Scavuzzi^c(Scavuzzi, A.M.L), alexandramariah@gmail.com

Weverton de Oliveira Alves^c(Alves, W. O.), tonny-allves@hotmail.com

Ana Catarina de Souza Lopes^c(Lopez, A. C. S.) ana.lopes.ufpe@gmail.com

Maria Betânia Melo de Oliveira^{a*}(Oliveira, M.B.M.), mbetaniam2008@gmail.com

Maria Tereza dos Santos Correia^{a*}(Correia, M.T.S), mtscorreia@gmail.com

^aLaboratório de Biologia Molecular, Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Pernambuco (UFPE),

Av. Prof. Moraes Rego, 1235 - Cidade Universitária, Recife, PE, Brasil, 50670-901.

^bLaboratório de Produtos Naturais, Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Av. Prof. Moraes Rego, 1235 - Cidade Universitária, Recife, PE, Brasil, 50670-901.

^cLaboratório de Bacteriologia e Biologia Molecular, Departamento de Medicina Tropical, Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Av. Prof. Moraes Rego, 1235 - Cidade Universitária, Recife, PE, Brasil, 50670-901.

^dLaboratório de Genomica e Proteomica de Plantas, Departamento de Genética, Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Av. Prof. Moraes Rego, 1235 - Cidade Universitária, Recife, PE, Brasil, 50670-901

*Corresponding author at: Laboratório de Biologia Molecular, Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Av. Prof. Moraes Rego, 1235 - Cidade Universitária, Recife, PE, Brasil, 50670-901. E-mail addresses: mtscorreia@gmail.com (Correia, M.T.S); mbetaniam2008@gmail.com (Oliveira, M.B.M.).

Abstract

Biofilm-associated infections caused by multidrug resistant (MDR) *Klebsiella pneumoniae* have increased mortality and morbidity in compromised patients. The searching for new strategies to treat these infections has been intensified in recent years. Thus, the usage of natural compounds has been lately as the alternative way of treatment. In this study, we investigated the antimicrobial and antibiofilm potential of phenolic compounds against *K. pneumoniae* MDR clinical isolates. In which the epidemiological profile, biofilm formation in different media and the presence of virulence genes (*fimH*, *mrkD*, *cps*) related to the biofilm were analyzed. For this, 34 isolates were used from two public hospitals (H1 and H2) in Recife-PE, Brazil and one sensitive isolate from the UFPEDA collection. The taxonomical identity of all isolates was confirmed by MALDI-TOF MS technique and resistance profile through VITEK 2 Compact automation equipment (BioMérieux®). To investigate the potential of biofilm formation, there was used Cristal Violet method (CV) comparing two culture media: Brain and Heart Infusion (BHI) and Luria-Bertanti (LB) supplied with glucose or not. In addition, it was verified the presence and frequency of three virulence genes (*fimH*, *mrkD*, *cps*) through Polymerase Chain Reaction (PCR). Lastly, there was investigated the potential antimicrobial and antibiofilm de five phenolic compounds (Gallic acid, 4-hidroxybenzoic acid, Caffeic acid, Trans-ferulic acid, and Quercetin. The isolates were confirmed as *K. pneumoniae* multidrug resistant and capable of forming strong biofilm in both media and conditions tested. Most of the isolates (29,4%) were from ICU (Intensive Care Unit), Neurosurgery and Coronary Unit (COU), 20,6% for both. The most site of infection was from rectal swabs (41,2%), followed by urine (26,5%) and Blood (5,9%). Regarding the resistance profile, distinct percentages were observed for the different antimicrobials tested, with emphasis on cephalosporins and carbapenems, where 100% of the isolates from H1 were resistant and 78,5% and 68%, respectively, resistant in H2. In relation to virulence genes, the most prevalent were *fimH* (73%) followed by *cps* (67%) and *mrkD* (34,7%). Between the hospitals, *cps* was more frequent in H1 isolates and *fimH* (41,2%) in H2 isolates. In relation to the five compounds tested, Caffeic and trans-ferulic acid were most effective against *K. pneumoniae* MDR isolates, presenting both growth and biofilm inhibition around 75%. This is the first report of antibiofilm formation and antimicrobial on *K. pneumoniae* MDR promoted by trans-ferulic acid which suggest that these compounds could be the alternative of choice to treat biofilm-associated infection caused by *K. pneumoniae* MDR isolates.

Keywords: Gram-negative, plant compounds, biological activity

Introdução

Em ambiente natural, as bactérias podem ser encontradas como células planctônicas e biofilme. Na forma planctônica, as bactérias têm mais motilidade, são mais suscetíveis às adversidades ambientais e são sensíveis aos agentes antimicrobianos. No entanto, no biofilme, as bactérias têm sua mobilidade reduzida, mas proteção ao meio ambiente e aos agentes antimicrobianos (SHAKIBAIE, 2018). Assim, cerca de 90% de todas as bactérias são propensas a viver na forma de biofilme como uma alternativa sobrevivente (VICKERY et al., 2013).

O biofilme é um conjunto de bactérias da mesma espécie ou de espécies diferentes, mesmo outros microorganismos, como fungos. Essas convergências bacterianas são auto-incorporadas em uma matriz produzida por substâncias poliméricas extracelulares (EPS) (FLEMMING et al., 2016; LÓPEZ; VLAMAKIS; KOLTER, 2010). A matriz EPS é composta por diferentes moléculas poliméricas, como proteínas, lípidos e ácidos nucleicos; no entanto, os principais componentes do biofilme são os exopolissacarídeos ((PLYUTA et al., 2013; SHAKIBAIE, 2018)).

Para formar o biofilme, as bactérias devem ser ligadas às superfícies abióticas ou bióticas. Essa capacidade de fixação permite que as bactérias colonizem, por exemplo, dispositivos médicos, como cateteres e implantes cirúrgicos, nos quais pode melhorar a taxa de infecção crônica (KHATOON et al., 2018; PLYUTA et al., 2013). Uma das principais causas para o estudo do biofilme é devido às bactérias nesse estado poderem resistir tanto à antibioticoterapia quanto ao hospedar o sistema imunológico humano. Assim, novas estratégias para prevenir ou quebrar o biofilme de bactérias têm sido bastante procuradas (LU et al., 2019; SONG et al., 2017).

Nos últimos anos, alguns pesquisadores procuraram novas substâncias como uma das estratégias que possivelmente inibem o biofilme de bactérias (LU et al., 2019). Alguns estudos mostraram que substâncias vegetais podem interferir na formação de biofilme por bactérias (SONG et al., 2017). Algumas dessas substâncias incluem polifenóis. Os compostos fenólicos são uma das classes de moléculas bioativas que as plantas produzem por meio de seus metabólitos secundários (DE LA ROSA et al., 2019).

Essa classe de moléculas é o grupo mais frequente de substâncias que podem ser encontradas em todo o reino vegetal, por exemplo, foram identificados cerca de 8000 compostos fenólicos

(COŞARCÉ et al., 2019; MIGUEL-CHÁVEZ, 2016). Flavonóides, ácidos fenólicos e taninos são algumas das classes de compostos fenólicos que podem ser encontrados nos órgãos e tecidos das plantas. Nos últimos anos, os compostos fenólicos têm recebido atenção por suas propriedades biológicas, mesmo para a própria planta e para a saúde humana (MINATEL et al., 2017). Entre todas as propriedades biológicas, muitos estudos têm demonstrado o potencial antioxidante (POURREZA, 2013), antinflamatório (LS; NJA, 2016), anticâncer (CRISTEA et al., 2017; GLISOVIC et al., 2018) antimicrobiano (CRISTEA et al., 2017; LI et al., 2019) e outras propriedades medicinais desses compostos. Embora poucos estudos tenham mostrado que alguns compostos fenólicos tinham atividade no biofilme produzido por *Burkholderia cepacia* e *Pseudomonas aeruginosa* (STREJCEK et al., 2018), os efeitos na atividade de formação de antibiofilme a partir de compostos fenólicos precisavam ser mais elucidados, principalmente em isolados clínicos de bactérias.

Klebsiella pneumoniae é um patógeno oportunista Gram-negativo que causa infecções associadas à assistência à saúde (infecções do trato respiratório, infecções do trato urinário (ITU) e infecções da corrente sanguínea). Esta espécie pode ser encontrada tanto em ambientes naturais como plantas, animais, solo e em seres humanos (MARTIN; BACHMAN, 2018). Além disso, esta bactéria tem uma alta capacidade de formação de biofilme, devido à essa capacidade, *K. pneumoniae* foi classificada como a segunda bactéria mais comum que causa bacteremia em pacientes imunocomprometidos com alta taxa de mortalidade (27,4-37,0%), (ZHENG et al., 2018).

Neste trabalho, foram analisados os perfis de resistência, formação de biofilme em diferentes meios e presença de genes de virulência (*fimH*, *mrkD*, *cps*) relacionados ao biofilme, juntamente com o efeito de alguns compostos sintetizados fenólicos (ácido gálico, ácido trans- ferúlico, ácido cafeico, ácido 4-hidroxibezóico e quercetina) em células planctônicas e biofilme de *K. pneumoniae* MDR.

Materiais e métodos

Aquisição dos isolados bacterianos

Os isolados de *K. pneumoniae* foram adquiridos pelo protocolo estabelecido em dois hospitais públicos de Recife, Pernambuco, Brasil de novembro a dezembro de 2018. A aquisição dos isolados foi aprovada pelo Comitê de Ética e Pesquisa da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), através do número de protocolo: 94626718.1.0000.5208 . 34. Isolados clínicos foram coletados em diferentes setores de dois hospitais públicos (H1 e H2) em Recife-PE, Brasil, e um isolado de *K. pneumoniae* (UFPEDA 396) do Departamento de Antibióticos da UFPE foi usado como controle para os experimentos. Todos os isolados foram armazenados em caldo e ágar de infusão cérebro-coração (BHI) (28 ° C) e em líquido BHI com glicerol a 15% (negativo a 20 ° C).

A identificação inicial e o perfil de resistência dos isolados ocorreram através do equipamento de automação VITEK 2 Compact (BioMérieux®). Para os perfis de resistência fornecidos pelos hospitais, os agentes antimicrobianos usados para classificar como MDR (resistente a múltiplas drogas), XDR (resistente a drogas extensas) e PDR (resistente a drogas) para isolados de Enterobacteriaceae estavam de acordo com Magiorakos et al., 2012, Aminoglicosídeos (amicacina, gentamicina), carbapenêmicos (Ertapenem, Imipenem, Meropenem), cefalosporinas de primeira e segunda geração (cefazolina), cefalosporinas de terceira e quarta geração (ceftriaxona, ceftazedima e cefepolinas), cefamoxitina (cefazititina) Ciprofloxacina), glicilciclinas (tigeciclina), penicilina, penicilinas + inibidores da β-lactamase (Ampicilina- sulbactam), polimixinas (Colistina).

Espectrometria de massas MALDI-TOF

Os isolados de *K. pneumoniae* foram confirmados taxonomicamente pela técnica MALDI-TOF/MS. Colônias bacterianas foram suspensas em 300 µL de água Milli-Q e foram adicionados 900 µL de etanol absoluto. As suspensões foram centrifugadas a 15.600 g por 2 min. O sobrenadante foi removido e o sedimento foi seco em SpeedVac por 20 min. Nas amostras, foram adicionados 50 µL de ácido fórmico (70%) e 50 µL de acetonitrila. A mistura resultante foi homogeneizada em um agitador de vórtice, centrifugada a 15.600 g por 2 min, e o sobrenadante foi transferido para um novo microtubo. A matriz preparada com ácido alfa-ciano-4-hidroxicinâmico (10 mg / mL), acetonitrila a 50% e ácido trifluoroacético a 0,3% foi adicionada à placa MALDI contendo as amostras em temperatura ambiente (18 °C) para cristalização. Os espectros de MS foram adquiridos no modo linear positivo (tensão de

aceleração: 20 kV e faixa de detecção - m / z: 2.000 - 20.000) usando o programa Flex Control Versão 3.0 no espectrômetro de massas MALDI-TOF Autoflex III (Bruker Daltonics, Billerica, MA, EUA). Os espectros de massa obtidos foram comparados com os dados obtidos no banco de dados MALDI Biotyper Versão 3.1.

Detecção de genes de Biofilme

O DNA genômico foi extraído de acordo com o protocolo descrito por Sambrook, et al. (2011) e armazenado a 20 °C negativo. A avaliação da presença de genes de biofilme fimH, cps, mrkD foi realizada pela Cadeia de Reação da Polimerase (PCR) e os primers testados estão listados na tabela 1. Uma mistura manual foi preparada usando dNTP a 8 mM, tampão 5x, MgCl₂ a 25 mM, Taq polymerase a 5 u / uL e iniciadores a 100 mM. Condição de PCR para cada gene: fimH, desnaturação inicial a 95 °C por 2 min, 33 ciclos de desnaturação a 94 °C por 1 min, temperatura de fusão foi de 62 °C por 1 min, extensão a 72 °C por 2 min e extensão final a 72 °C por 7 min. cps, desnaturação inicial a 96 °C por 2 min, 35 ciclos de desnaturação a 96 °C por 1 min, temperatura de fusão a 63 °C por 1 min, extensão a 72 °C por 1 min e extensão final a 72 °C por 10 min. mrkD, desnaturação inicial a 95 °C, 33 ciclos de desnaturação a 94 °C por 30 s, temperatura de fusão a 60 °C por 30 s, extensão a 72 °C por 1 min e 72 °C por 7 min. Os amplicons foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 1,2% e tampão TBE 0,5X e visualizados pelo corante SYBR® Green no fotodocumentador sob luz UV.

Tabela 1: – Lista de *primers* utilizados para identificar genes de biofilme em MDRs de *K. pneumoniae*.

Gene	Primers (5' → 3')	Tm (°C)	Reference
<i>FimH</i>	F: TCCACAGTCGCCAACGCTTC		
	R: GCTCAGAACATCGGTAAAC	62 °C	
<i>MrkD</i>	F: TCCAATTGTGACCGAAATC		Melo <i>et al.</i> , 2014
	R: GCTCGGGCACCAAGCTGA	60 °C	
<i>Cps</i>	F: CCACCAACTATTCCCTCGAA		Scavuzzi <i>et al.</i> , 2019
	R: ATGGAACCCACATGACATT	63 °C	

Testes de formação de Biofilme

O biofilme de *K. pneumoniae* foi determinado pelo método Violet Crystal descrito por Stepanović *et al.* (2007) sob diferentes condições: dois meios de cultura, caldo de infusão de coração cerebral (BHI), caldo de Luria-Bertani (LB); além disso, foi adicionada glicose a 10%

ou não. A formação de biofilme foi quantificada usando densidade óptica a 570 nm (OD 570), e os isolados foram classificados como produtores fracos, moderados e fortes de biofilme ou não produtores de biofilme. As amostras foram classificadas como biofilme fortemente ($4 \times OD_c < OD_s$) moderadamente ($2 \times OD_c < OD_s \leq 4 \times ODC$) ou fracamente ($OD_c < OD_s < 2 \times OD_c$).

Aquisição dos Compostos

Os seguintes compostos: ácido gálico, ácido trans-ferúlico, ácido cafeico, ácido 4-hidroxibezóico e queracetina foram utilizados no presente estudo e adquiridos comercialmente na empresa Sigma-Aldrich.

Concentração inibitória mínima (CIM) e Concentração bactericida mínima (MBC)

Os produtos MIC e MBC foram avaliados usando uma placa de microtitulação de 96 poços, de acordo c. Onde foram adicionados 160 μl de meio caldo BHI em cada poço. Todos os compostos foram diluídos para uma concentração final de 2000, 1000, 500, 250, 125 $\mu\text{g} / \text{mL}$ por cada poço. A densidade microbiana foi ajustada para $1,5 \times 10^8 \text{ UFC} / \text{mL}$ e 20 μl foram inoculados em cada poço. A CIM de todos os compostos para isolados de *K. pneumoniae* MDR foi determinada como a menor concentração em que 90% da inibição do crescimento foi detectada.

Atividade antibiofilme

O efeito inibitório de todos os compostos na formação de biofilme do isolado de *K. pneumoniae* foi avaliado pelo método descrito por Trentin et al. (2011) com algumas modificações. A densidade do inóculo foi ajustada para $1,5 \times 10^8 \text{ UFC} / \text{mL}$. Foram adicionados 20 μl de todos os compostos a uma placa de microtitulação de 96 poços, juntamente com 20 μl de inóculo e 160 μl de caldo BHI. A placa de 96 poços foi incubada por 24 h. Após o período de incubação, o conteúdo foi descarregado e lavado 3 vezes com solução salina a 0,9%. Para fixar o biofilme, a placa foi incubada a 55°C por 60 min. A atividade antibiofilme foi então determinada pelo método do cristal violeta. Foi utilizado cristal violeta a 0,4% durante 15 min. Depois disso, a placa foi lavada 3 vezes com água destilada, seguida de uma adição de etanol a 100% por 40 min. Foi feita uma leitura a 570 nm para ver os resultados. Um controle com apenas meio de cultura e bactérias foi usado como 100% de crescimento. Valores acima de 100% foram considerados estimuladores e inibitórios abaixo dele.

Análise estatística

Todos os ensaios foram realizados em experimentos quadruplicados e três independentes. Foi calculado a média e o desvio padrão. Através do GraphPad Prism (versão 5.0) foram produzidos os gráficos e os resultados analisados por análise de variância (ANOVA) com o pós-teste de Tukey. As diferenças foram consideradas estatisticamente significantes quando os valores de p foram menores que 0,05.

Resultados

Identificação bacteriana

Os isolados foram identificados taxonomicamente como *K. pneumoniae* pelo método automatizado Vitek 2 Compact Biomeérieux e confirmado pelo MALDI-TOF MS, no qual apresentaram valores de escore entre 2.083 e 2.459, indicando altos índices de compatibilidade e confiabilidade (Tabela 2).

Tabela 2 - Características de *K. pneumoniae* MDR coletadas em hospitais de Recife-PE.

Identification	MALDI-TOF/MS Score	Infection site	Isolation sector	Resistance classification	Biofilm formation				Biofilm gene profiles		
					BHI	BHI + G	LB	LB + G	fimH	mrkD	cps
UFPEDA 396		UFPEDA Collection	--	Sensibly	++	+++	+++	+++	--	--	--
H2.110.11	2.230	Peritoneal fluid	Neurosurgery	Sensibly	++	++	++	+	+	+	+
H1.14902	2.150	Blood	Emergency	MDR	+	++	++	+	--	+	+
H1.14990	2.223	Rectal swab	ICU	MDR	+	+++	++	++	+	+	+
H2.302.11	2.301	Peritoneal fluid	ICU	MDR	+++	+++	+++	++	+	--	--
H2.342.11	2.342	Urine	Emergency	Sensibly	NP	+	NP	NP	+	--	+
H2.353.11	2.423	Urine	Medical Clinic	MDR	++	+++	+++	+	+	+	+
H2.541.11	2.185	Urine	Emergency	MDR	+++	+++	++	++	+	--	+
H1.15520	2.303	Rectal swab	ICU	MDR	+	++	+	+	--	+	+
H1.15543	2.120	Rectal swab	ICU	MDR	+++	+++	+++	++	+	+	+
H2.826.11	2.097	Urine	Medical Clinic	MDR	+++	++	++	++	+	+	+
H2.968.11	2.207	Nasal swab	Neurosurgery	MDR	+++	+++	+++	++	+	+	+
H2.969.11	2.430	Rectal swab	Neurosurgery	MDR	+++	+++	++	+++	+	+	+
H1.15918	2.457	Rectal swab	COU	MDR	+++	+++	+	NP	+	+	+
H1.15957	2.427	Pleural fluid	COU	MDR	+	+++	++	+	+	+	+
H1.15992	2.330	Urine	Home Hospital	MDR	+++	+++	+++	+++	+	+	+
H1.16190	2.181	Tissue	ICU	MDR	NP	++	+	NP	+	+	+
H1.16335	2.232	Blood	ICU	MDR	+	+	+	NP	+	+	+
H1.16386	2.455	Tracheal secretion	COU	MDR	++	+	+++	++	+	+	+
H1.16389	2.413	Rectal swab	Cardiology	MDR	++	++	++	+	+	+	+
H1.16420	2.285	Urine	COU	MDR	+	+	+	+	--	--	+
H2.481.12	2.176	Rectal swab	Neurosurgery	MDR	+++	++	++	+	+	+	-
H2.584.12	2.345	Cerebrospinal fluid	Pediatrics	MDR	++	++	+++	++	+	--	+
H2.599.12	2.167	Rectal swab	ICU	MDR	+++	+++	++	++	--	--	--
H2.653.12	2.113	Rectal swab	Neurosurgery	MDR	+++	++	++	+	--	--	--
H2.672.12	2.083	Urine	ICU	MDR	+++	++	+++	++	--	--	--
H2.686.12	2.342	Rectal swab	ICU	MDR	+++	++	+++	++	--	--	--
H1.16811	2.213	Rectal swab	COU	MDR	+	++	+	+	+	+	+
H1.16814	2.287	Rectal swab	COU	MDR	++	++	++	++	--	+	+
H1.16819	2.175	Rectal swab	COU	MDR	++	++	++	+	+	+	+
H2.749.12	2.342	Rectal swab	Neurosurgery	MDR	+++	+++	+++	++	+	--	--
H2.792.12	2.379	Urine	ICU	Sensibly	++	+	+++	+	--	+	-
H2.825.12	2.419	Urine	Neurosurgery	Sensibly	+++	+++	+++	++	+	+	--
H2.828.12	2.447	Abscess	Medical Clinic	MDR	+++	+++	+++	++	--	--	--
H2.829.12	2.459	Abscess	Medical Clinic	MDR	+++	+++	+++	++	--	--	--

UTI- Unidade de Terapia Intensiva, COU- Unidade Coronária, MDR- Múltiplas Drogas Resistente, IH- Infusão de cérebro e coração, G- Glicose, LB- Luria Bertani, NP- Não Produtores de Biofilme.

Epidemiologia bacteriana

De acordo com os perfis de suscetibilidade fornecidos pelos hospitais e Margiorakos et al. (2012) classificação; dos 34 isolados, 30 (88,2%) mostraram ser multirresistentes (MDR) e quatro (11,8%) foram classificados como não resistentes. Os setores mais freqüentes do H1 foram Unidade Coronariana (UCO) e Unidade de Terapia Intensiva (UTI), com 22,5% e 14,3%, respectivamente. Em relação aos setores H2, os mais frequentes foram Neurocirurgia e UTI, 20,6% e 14,7%, respectivamente. Também foi observada a presença de isolados de MDR em outros setores hospitalares, como: Clínicas médicas (11, 8%), Emergência (8,3%), Pediatria (2,9%) e Cardiologia (2,9%). Em relação aos locais de colonização nos dois hospitais, a maioria dos isolados de MDR foi coletada de swab retal (41,2%) e urina (26,5%). Havia também coletas de outros locais de colonização, mas com menor percentual. 5,9% foram coletados de sangue, abscesso e líquido peritoneal; menos ainda, 1,9% foram coletados de líquido pleural, líquido cefalorraquidiano, tecido, swab nasal e secreção traqueal. Todas essas frequências incluem os dois hospitais e são apresentadas na tabela 3.

Tabela 3 - Frequência das características epidemiológicas de *K. pneumoniae* MDR de dois hospitais de Recife, Brasil.

Características	Hospital 1	Hospital 2	Total
Total n. (%)	16 (45,7)	19 (55,9)	35 (100)
Perfil de resistência como MDR n. (%)	15 (44,1)	15 (44,1)	30 (88,2)
Setor de isolamento n. (%)			
UTI	5 (14,7)	5 (14,7)	10 (29,4)
Neurosirurgia	0 (0,0)	7 (20,6)	7 (20,6)
Pediatria	0 (0,0)	1 (2,9)	1 (2,9)
UCO	7 (20,6)	0 (0,0)	7 (20,6)
Clínica médica	0 (0,0)	4 (11,8)	4 (11,8)
Emergência	0 (0,0)	3 (8,6)	3 (8,6)
Cardiologia	1 (2,9)	0 (0,0)	1 (2,9)
Hospital em casa	1 (2,9)	0 (0,0)	1 (2,9)
Sítio de infecção n. (%)			
Swab retal	8 (23,5)	6 (17,6)	14 (41,2)
Sangue	2 (5,9)	0 (0,0)	2 (5,9)
Urina	2 (5,9)	7 (20,6)	9 (26,5)
Fluido pleural	1 (2,9)	0 (0,0)	1 (2,9)
Fluido peritoneal	0 (0,0)	2 (5,9)	2 (5,9)
Fluido cérebro-espinhal	0 (0,0)	1 (2,9)	1 (2,9)
Swab nasal	0 (0,0)	1 (2,9)	1 (2,9)
Abscesso	0 (0,0)	2 (5,9)	2 (5,9)
Tecido	1 (2,9)	0 (0,0)	1 (2,9)
Secreção traqueal	1 (2,9)	0 (0,0)	1 (2,9)

Formação de biofilme n. (%)			
Biofilme forte em BHI	3 (8,6)	14 (41,2)	17 (50,0)
Biofilme forte em BHI+G	3 (8,6)	12 (35,3)	15 (44,1)
Biofilme forte em LB	3 (8,6)	11(32,3)	14 (41,2)
Biofilme forte em LB+G	0 (0,0)	4 (11,8)	4 (11,8)
Genes de virulência n. (%)			
<i>FimH</i>	11 (32,3)	14 (41,2)	25 (73,5)
<i>MrkD</i>	13 (38,2)	9 (26,5)	22 (64,7)
<i>Cps</i>	14 (41,2)	9 (26,5)	23 (67,6)

Legenda: UTI- Unidade de Terapia Intensiva, COU- Unidade Coronariana, IHB- Infusão de Cérebro e Coração, G- Glicose, LB- Luria Bertani.

Em relação aos perfis de resistência dos 34 isolados de MDR, foram testados 15 agentes antimicrobianos e distribuídos em suas classes correspondentes (listadas na metodologia). A Figura 1 mostra os perfis de resistência encontrados em *K. pneumoniae* dos dois hospitais (H1 e H2). Assim, observou-se que os isolados do Hospital 1 mostraram-se mais resistentes a todos os antibióticos testados. Quando comparado aos isolados do Hospital 2.

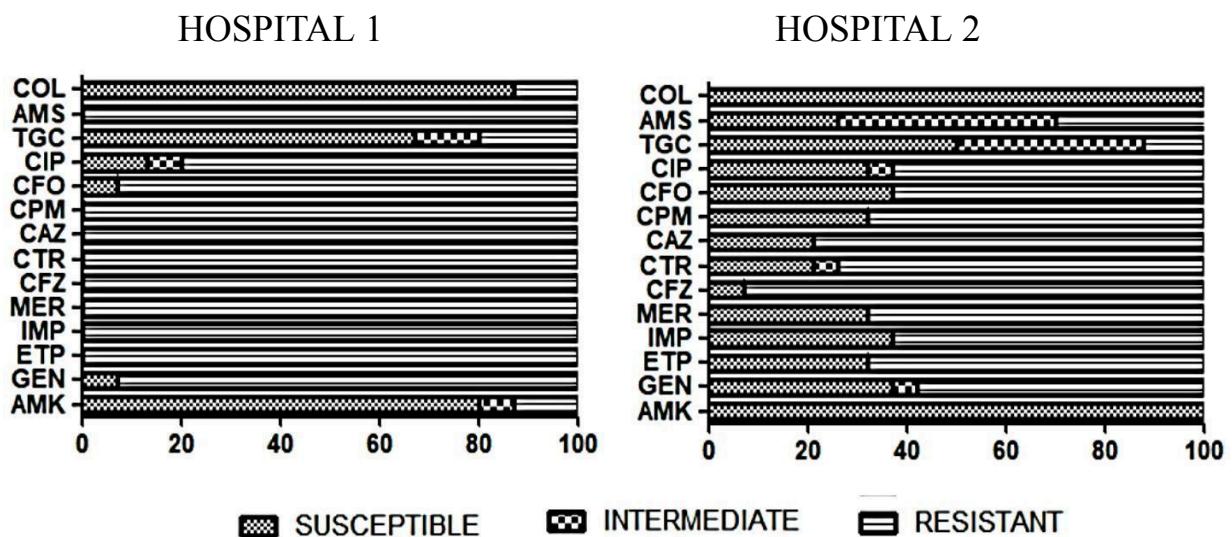
Eventualmente, a resistência pode ser variável, dependendo dos antibióticos e do número de isolados resistentes e sensíveis de cada hospital. Assim, antibióticos das classes de cefalosporinas (cefazolina, cefepima, ceftazidima, ceftriaxona), carbapenêmicos (Ertapenem, Imipenem, Meropenem) e cefamicina (cefoxitina) foram menos eficazes para os isolados do H1. Os isolados do Hospital 1 foram 100% resistentes às cefalosporinas, carbapenêmicos e 93% às classes de cefamicina. Quando comparado ao H2, 78,5% eram resistentes às cefalosporinas, 68% aos carbapenêmicos e 63% à cefamicina. Para a classe Fluoroquinolona (Ciprofloxacina), os isolados H1 apresentaram 80% e 7%, foram resistentes e intermediários à Ciprofloxacina. Os isolados de H2 foram de 63%, 5%, 32% e resistentes e intermediários ao mesmo antimicrobiano.

Em relação à classe dos aminoglicosídeos (amicacina e gentamicina), apenas os isolados H1 apresentaram resistência a esses antimicrobianos. 13% e 7% eram resistentes e intermediários, respectivamente, à amicacina, enquanto 93% eram resistentes à gentamicina. Os isolados de H2 foram resistentes apenas à gentamicina, com 58% e 5% foram resistentes e intermediários, respectivamente.

A classe de glicilciclínas (tigeciclina), isolados de H2, foram 50%, 37%, 12% suscetíveis, intermediários e resistentes, respectivamente. Os isolados H1 foram 20% e 13% resistentes e intermediários, respectivamente, ao mesmo agente antimicrobiano. Em relação às

polimixinas (Colistina), apenas 13% dos isolados de H1 apresentaram resistência a esse antimicrobiano.

Figura 1 - Perfil de resistência de todos os isolados dos dois hospitais.



Legenda: AMK (Amicacina), GEN (Gentamicina), ETP (Ertapenem), IMP (Imipenem), MER (Meropenem), CFZ (Cefazolin), CRT (Ceftriaxona), CAZ (Ceftazidima), CPM (Cefepime), CFO (Cefoxitina), CIP (Ciprofloxacin), TGC (Tigeciclina), AMS (Ampicilina-Sulbactam), COL (Colistina).

Formação de biofilme

Neste estudo, todos os isolados foram capazes de formar biofilme, como é mostrado na Tabela 2. Para todas as culturas de meio testadas (BHI, BHI + G, LB e LB + G), observou-se que a maioria dos isolados era fortemente produtores de biofilme em BHI (50%), seguidos por BHI + G (44%), NV (41%) e NV + G (12%) (Tabela 3).

Determinação e Frequência dos genes *fimH*, *mrkD*, and *cps*.

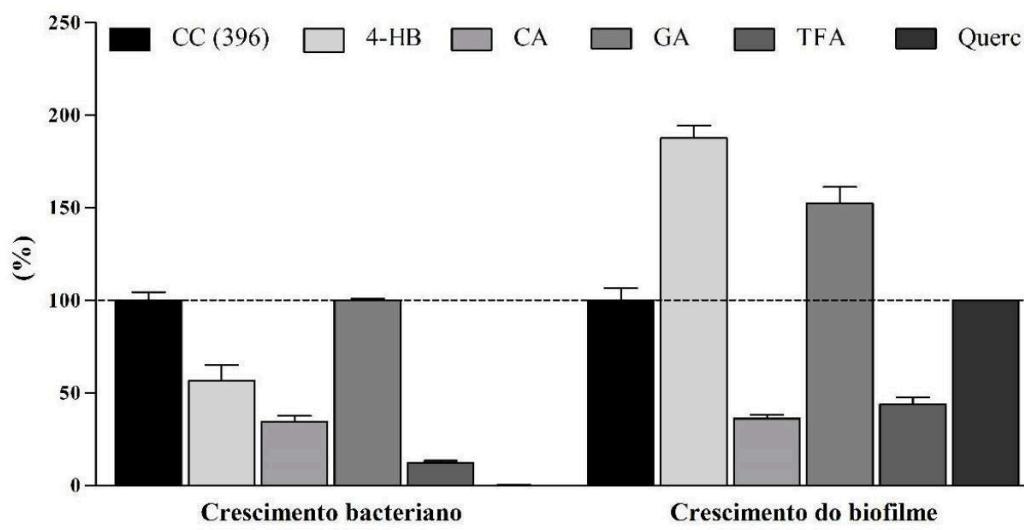
No presente estudo, investigou-se a presença e frequência de genes relacionados ao biofilme; *fimH*, *mrkD*, *cps*. Como mostra a tabela 3, o gene mais prevalente foi *fimH* (73,5%). *Cps* (67,6%) mostrou-se o segundo mais prevalente; enquanto que *mrkD* (64,7%) foi o terceiro. Além disso, observou-se que os isolados apresentavam perfis genéticos diferentes (Tabela 2). O perfil *fimH* + *mrkD* + *cps* foi observado em 47% dos isolados. O perfil de *mrkD* + *cps* foi observado apenas em três isolados (A14990, A15520, A16811), apresentando 8,6%, bem como perfis de *fimH* + *cps* nos isolados (R342.12, R541.12, R584.12). Dois isolados (R481.12, R825.12) apresentaram perfil *fimH* + *mrkD*, o que corresponde a 5,9% de Perfis com apenas um dos genes. Seis isolados (17,6%) apresentaram apenas um dos genes e quatro

(11,8%) juntamente com o controle UFPDA 396 não mostraram presença de todos os genes testados.

Concentração Mínima Inibitória (MIC) e Atividade Antibiofilme

Para avaliar a capacidade dos compostos fenólicos de inibir o crescimento bacteriano e a formação de biofilme, foram testados cinco compostos fenólicos (listados acima). Todos os compostos estavam em 2000 µg/mL. Um teste inicial foi realizado com uma bactéria não resistente (UFPDA 396). Na figura 2, os gráficos mostram a atividade antimicrobiana e antibiofilme dos compostos fenólicos. Como observado na figura 2, o ácido 4-hidroxibenzólico apresentou inibição do crescimento (50%) e formação de biofilme estimulante (94%) na concentração testada. Os ácidos transferúlico (80% e 50%) e cafeico (65% para ambos) tiveram um efeito inibidor no crescimento bacteriano e na formação de biofilme, respectivamente. O ácido gálico foi o único composto que não apresentou atividade de inibição de crescimento e biofilme, mas aumentou a produção de biofilme em 50%. A queracetina mostrou-se bactericida a 2000 µg / mL. No entanto, não teve efeito na formação de biofilme a partir da bactéria testada.

Figura 11 – Efeito Antimicrobiano e Antibiofilme dos Compostos Fenólicos sobre *K. pneumoniae* UFPDA 396.

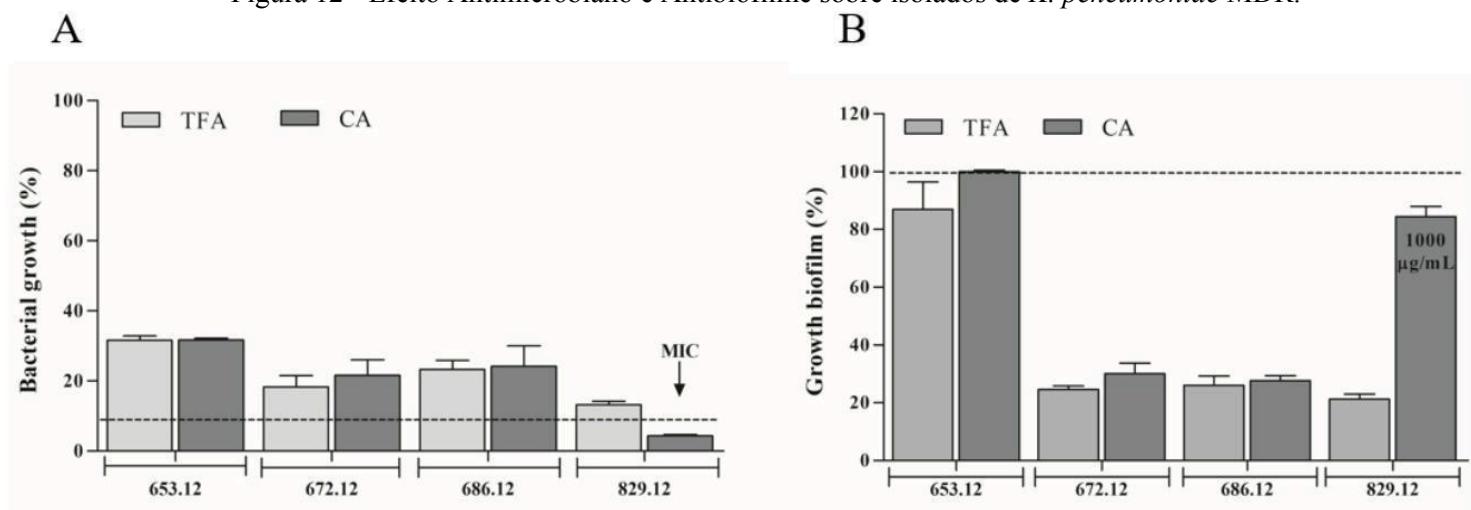


Legenda: Ácido 4-hidroxibenzólico (4-HB), ácido cafeico (CA), ácido galico (GA), ácido trans-ferúlico (TFA) e queracetina (Querc) nas células planctônicas e biofilme do UFPDA 396. Erro barras indicam desvio padrão.

Para verificar se os compostos fenólicos também possuem atividade antimicrobiana e antibiofilme em isolados resistentes, foram escolhidos os compostos que apresentaram

melhores resultados nos dois ensaios. De acordo com os resultados mostrados na Figura 2, foram escolhidos os ácidos trans-ferúlico e cafeico. Quatro dos 34 isolados de MDR (653.12, 672.12, 686.12 e 829.12) foram escolhidos para os ensaios. A figura 3A-B mostra a atividade de inibição de crescimento e biofilme dos ácidos trans-ferúlico e cafeico. Os compostos também estavam em 2000 µg / mL. Para a atividade antibiofilme, o ácido cafeico estava em 1000 µg / mL (figura 3B) devido ao fato de ter demonstrado CIM em uma concentração inicial testada.

Figura 12 - Efeito Antimicrobiano e Antibiofilme sobre isolados de *K. pneumoniae* MDR.



Legenda: Ácido trans-ferúlico (TFA) e do ácido cafeico (CA) no crescimento bacteriano e na inibição de biofilme de isolados de MDR (653.12, 672.12, 686.12 e 829.12). Barras de erro indicam desvio padrão.

Discussão

A *Klebsiella pneumoniae* é conhecida como um dos principais microrganismos relacionados à causa de infecção hospitalar em pacientes comprometidos. Em seguida, é necessária uma identificação precisa e rápida dos microrganismos clínicos para um melhor tratamento para pacientes comprometidos (PASTERNAK, 2012).

Assim, uma técnica emergente como MALDI-TOF/MS (*Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry*) é usada como uma opção alternativa na rotina clínica para diagnósticos microbianos (LI et al., 2019). No presente estudo, essa técnica confirmou através de identidade molecular 100% do isolado como *K. pneumoniae*, revelando sua importância para estudos taxonômicos. No entanto, nos últimos anos, a literatura mostrou que o MALDI-TOF pode ser aplicado para outros fins, tais como: Estudos epidemiológicos e

detecção de resistência a antibióticos e detecção de patógenos sanguíneos e do trato urinário, auxiliando no campo da taxonomia, epidemiologia e áreas afins (SINGHAL et al., 2015).

A identificação molecular de isolados de *K. pneumoniae* é essencial, pois esse microrganismo tem mostrado alto perfil de resistência a diferentes classes de antimicrobianos, o que dificulta seu tratamento no ambiente hospitalar. Sabe-se que infecções causadas por bactérias gram-negativas MDR (MDR-GNB) são dificeis de tratar devido à sua resistência aos agentes mais antimicrobianos. Além disso, ainda existe um grande desafio no tratamento de infecções por *K. pneumoniae* MDR (BASSETTI et al., 2018). Sales et al. (2014) afirmam que a UTI é considerada um local epicentral com alta prevalência de bactérias MDR nas quais tem sido observado em todo o mundo (FLORES et al., 2016). Outros estudos também relataram a alta prevalência dessa bactéria MDR em UTIs de todo o mundo, incluindo o Brasil (CONCI CAMPOS et al., 2017; CADAVID et al., 2018; BASSETTI et al., 2018). No entanto, neste estudo, a neurocirurgia foi o setor mais prevalente para o H2 (20,6%), enquanto a UTI foi o segundo com 14,7%. No Hospital 1, os setores mais prevalentes foram UCO (20,6%) e UTI com (14,7%). (GUANGHUI et al., 2020), relatam alta incidência de infecções pós-neurocirurgia causadas por Enterobactereacea principalmente por Enterobacteriacea (CRE) resistente a carbapenem. Para reforçar esses dados (KU et al., 2017), argumentam que a meningite associada à *K. pneumoniae* MDR aumentou de 25 a 40% entre os adultos. Além disso, Ptrial et al. (2019) relataram dois casos de infecções pós-neurocirurgia causadas por *K. pneumoniae* MDR no Brasil.

Em relação aos locais de isolamento, houve prevalência de swab retal (41,2%), incluindo os dois hospitais, como principal local de coleta. É possível que o swab retal seja usado na vigilância rotineira pelos profissionais de saúde pública para a triagem de bactérias entéricas MDR, que inclui as bactérias CRE ((GLISOVIC et al., 2018) As amostras de urina foram o segundo maior local de coleta com 25,7% o que pode ser explicado devido ao trac urinário ser um dos locais de infecção causada por *K. pneumoniae* MDR Cristea et al. (2017) e Li et al. (2019) relatam que os isolados de *K. pneumoniae* MDR foram mais predominantes em amostras de urina em relação a outro tipo de conjunto de sites.

De acordo com os testes suscetíveis, os isolados de H1 e H2 apresentaram resistência a quase todos os agentes antimicrobianos testados, independentemente, com porcentagens distintas. Os agentes antimicrobianos das cefalosporinas e carbapenêmicos são a primeira escolha para o tratamento contra a infecção causada por essa bactéria. Além disso, os

carbapenêmicos são considerados o último recurso para o tratamento de infecções associadas à saúde (IRAS) (FERREIRA et al., 2019). Além disso, Temkin et al. (2018) apontaram que em 2014 havia uma taxa de 50,1 milhões de infecções resistentes graves às cefalosporinas associadas (principalmente para a terceira geração) e 3,1 milhões de infecções graves resistentes ao carbapenem. Além disso, este autor citou um relatório do O'Neill Report encomendado pelo governo do Reino Unido de que 700.000 mortes foram estimadas por ano em todo o mundo e isso é atribuído a infecções causadas por seis espécies resistentes a antimicrobianos, entre as quais *K. pneumoniae*.

Navon-Venezia, Kondratyeva e Carattoli, (2017) relatam um aumento na taxa de resistência de 2005 a 2015, no qual o *K. pneumoniae* MDR teve um aumento de 50% a 60% na taxa de resistência à fluoroquinolona e aos aminoglicosídeos. No entanto, Ramirez; Tolmasky (2017) argumenta que a amicacina ainda é uma fonte alternativa para tratar infecções associadas a aminoglicosídeos devido à sua resistência a enzimas modificadoras de aminoglicosídeos. Por outro lado, o mesmo autor relata a presença de uma acetiltransferase mediada por plasmídeo, agora conhecida como aac- (6') - Ib. Esta enzima confere resistência ao complexo gentamicina.

Além disso, a colistina (polimixina) também foi testada. Os isolados H1 eram 20% resistentes, o que significa que ainda é considerável como fonte de tratamento para a infecção por *K. pneumoniae* MDR. No entanto, tem sido relatado um aumento mundial de *K. pneumoniae* resistente à colistina, o que limita as opções de tratamento antimicrobiano (PETROSILLO; TAGLIETTI; GRANATA, 2019). Boszczowski et al., 2019 revelam o surgimento de *K. pneumoniae* resistente à colistina de um hospital de ensino de São Paulo, o que concorda com a presença (13%) de resistência à colistina de isolados de H1 neste estudo.

Embora o microorganismo presente no biofilme frequentemente tenha resistência a antibióticos, eles estão recebendo resistência a desinfetantes e anti-sépticos comuns que são regularmente (LAHIRI et al., 2019). Todos os isolados de MDR de ambos os hospitais tinham a capacidade de formar biofilme em diferentes meios fornecidos ou não com glicose, mas mostraram intensidade de formação diferente, como mostrado nas tabelas 2 e 3. Embora no meio BHI, alguns dos isolados de MDR fossem produtores de não-biofilme , a maioria dos isolados de MDR (50%) tinha capacidade de produzir biofilme fortemente quando comparado ao BHI + G (44,1%), LB (41,2%) e LB + G (11,8%). Singh et al. (2019), relataram que o BHI é o meio de escolha para a formação de biofilme. Além disso, há relatos de que esse meio foi o

melhor meio para crescimento de bactérias, aderência e formação de biofilme para outras espécies de bactérias (WIJESINGHE et al., 2019). Além disso, (SINGH et al., 2019) também citou que o meio BHI possui os nutrientes necessários para a produção de fimbriae e pili, essenciais para a primeira adesão ao substrato.

Assim, neste estudo foram investigados genes de virulência (*fimH*, *mrkD* e *cps*) associados à formação de biofilme. Muitos autores relataram a importância desses fatores de virulência na formação de biofilme por *K. pneumoniae* MDR (ARAÚJO LIMA et al., 2020; STAHLHUT et al., 2012; VUOTTO et al., 2014). Em média, 68,6% de todos os isolados de MDR apresentaram todos os genes testados, enquanto 11,8% não apresentaram nenhum dos genes (Tabela 2 e 3). Todos os isolados de MDR apresentaram perfis genéticos diferentes; em que o perfil *fimH* + *mrkD* + *cps* foi mais frequente (47%). Alguns autores apontaram que a alta presença de fatores de virulência aumenta a formação de biofilme na *K. pneumoniae* MDR. No entanto, outros autores relatam a resistência da relação inversa (ARAÚJO LIMA et al., 2020; RAMOS-VIVAS et al., 2019). Neste estudo, não houve relação observada entre o perfil de resistência e a formação de biofilme. Além disso, Araújo Lima et al. (2020) relatam que o processo de formação de biofilme envolve eventos multifatoriais ou envolve características intrínsecas do patógeno.

Além disso, sabe-se que as bactérias formadoras de biofilme apresentam desafios formidáveis no tratamento de infecções, e a necessidade de novos agentes antimicrobianos relativamente potentes contra microorganismos no estado do biofilme, tem sido uma das novas estratégias. Neste estudo também foi investigado se alguns compostos fenólicos exercem atividades de formação de antimicrobianos e antibiofilmes em isolados de *K. pneumoniae* MDR. Foi demonstrado que uma vasta classe de compostos, pertencentes ao grupo de compostos fenólicos, possui propriedades antimicrobianas contra uma ampla gama de microrganismos, principalmente bactérias (VUOTTO et al., 2014; WALSH et al., 2019).

Dos cinco compostos na concentração testada, dois compostos (ácido gálico e ácido 4-hidroxibenzóico) mostraram efeito diferente na bactéria UFPEDA 396 (figura 4). O ácido gálico e o 4-hidroxibenzóico aumentaram 0,5 vezes e 1 vez a produção de biofilme, respectivamente, pela UFPEDA 396. Segundo Plyuta et al. (2013), dependendo da concentração, esses compostos podem agir de maneira diferente, estimulando ou reduzindo a formação de biofilme.

Estudos mostraram que a quercetina pode reduzir o crescimento bacteriano e a formação de biofilme (JAISINGHANI, 2017; OUYANG et al., 2016; WANG et al., 2018) em menor concentração em comparação com outros microorganismos como *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Proteus vulgaris*, *Escherichia coli*. Entretanto, nossos resultados demonstram a necessidade de uma dose mais alta para inibir o crescimento de *K. pneumoniae* 396. Além disso, observou-se que este composto não teve efeito na formação de biofilme. Concluindo isso, é necessária uma investigação adicional para entender o mecanismo de proteção dessa espécie de bactéria sobre esse composto.

No entanto, o ácido trans-ferúlico e o ácido cafeico apresentaram crescimento e formação de biofilme. Plyuta *et al.* (2013). relatou uma ação estimulante do ácido ferúlico no biofilme de *P. aeruginosa*, dependendo da concentração testada. No entanto, nossos dados não mostram atividade estimulante na formação de biofilme de *K. pneumoniae* 396 pelo ácido trans-ferúlico e cafeico. Além disso, esses compostos apresentaram inibição do crescimento e da formação de biofilme nos MDRs testados por *K. pneumoniae*. Para o teste desses isolados, os ácidos trans-ferúlico e cafeico apresentaram uma média de 75% de inibição para as duas atividades testadas. Não obstante, para o isolado 653.12, no qual nem os ácidos trans-ferúlico nem o cafeico tiveram atividade antibiofilme. Para o isolado 829.12, no qual o ácido cafeico apresentou MIC, mas em concentração subinibitória (1000 µg/mL) o composto não apresentou atividade de formação de antibiofilme. Kot *et al.* (2015) relataram o efeito inibidor do ácido ferúlico a 0,5% na formação de biofilme pelo isolado clínico *E. coli* em cateter urinário.

Kot *et al.* (2019) relataram a atividade antimicrobiana dos ácidos cafeicos trans-ferúlico contra isolados de bactérias de peixes; no entanto, foi necessária uma concentração maior (3,12 mg / mL) para atingir essa atividade. Wijesundara e Vasantha Rupasinghe (2019) apontaram a formação de antibiofilme em *Staphylococcus pyogenes* a partir de extratos etanólicos de plantas, o autor relacionou a presença de ácidos ferúlico e cafeico entre outros. Muñoz-Cazares *et al.* (2017), em sua revisão, argumentam que o ácido ferúlico e o cafeico tinham propriedades de atividade antibiofilme. Além disso, na mesma revisão, eles apontaram o primeiro relatório sobre a atividade de antibiofilme contra *S. epidermidis* promovida pelo ácido cafeico e a capacidade do ácido ferúlico de controlar a formação de biofilme em *E. coli* e *Listeria monocytogenes*. Além disso, nossos dados são o primeiro relato de ácido trans-ferúlico promovendo a atividade antibiofilme em *K. pneumoniae* MDR isola fortemente produtores de biofilme.

Conclusão

Os dados gerados pelo estudo apresentaram alta incidência e disseminação de isolados de *K. pneumoniae* multirresistentes e produtores de biofilme em diferentes setores hospitalares de dois hospitais públicos de Recife-PE. Os perfis de resistência e biofilme observados em *K. pneumoniae* indicam que a terapia convencional ainda é pouco eficaz no tratamento de infecções causadas por essa espécie de bactéria. Assim, um monitoramento contínuo das práticas laboratoriais e a vigilância epidemiológica devem ser realizados para minimizar a disseminação nos ambientes hospitalares. Como alternativa terapêutica para minimizar a infecção associada ao biofilme, demonstramos o potencial de alguns compostos fenólicos. O ácido cafeico e trans-ferúlico foram os compostos mais relevantes neste estudo. Eles foram capazes de reduzir a formação de biofilme de isolados de *K. pneumoniae* MDR. Além disso, nossos dados são o primeiro relato de ácido trans-ferúlico promovendo a atividade antibiofilme em isolados *K. pneumoniae* MDR fortemente produtores de biofilme.

Declaração de interesse concorrente

Os autores declaram que não têm interesses concorrentes.

Reconhecimentos

Este trabalho foi apoiado pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES); e o Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq). Os autores agradecem à Central Analítica do Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste (CETENE) pelo espaço concedido.

Referências

- BASSETTI, M. et al. Multidrug-resistant klebsiella pneumoniae: Challenges for treatment, prevention and infection control. **Expert Review of Anti-Infective Therapy**, v. 16, n. 10, p. 749–761, 2018.
- MAGIORAKOS, A. P. et al. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: An international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 18, n. 3, p. 268–281, 2012.
- MARTIN, R. M.; BACHMAN, M. A. Colonization, infection, and the accessory genome of Klebsiella pneumoniae. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 8, n. JAN, p. 1–15, 2018.
- MELO, R. DE C. A. et al. Presence of fimH, mrkD, and irp2 Virulence Genes in KPC-2-Producing Klebsiella pneumoniae Isolates in Recife-PE, Brazil. **Current Microbiology**, v. 69, n. 6, p. 824–831, 2014.
- SCAVUZZI, A. M. L. et al. Emergence of blaNDM-1 associated with the aac(6')-ib-cr, acrB, cps, and mrkD genes in a clinical isolate of multi-drug resistant Klebsiella pneumoniae from Recife-PE, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 52, n. March, p. 0–3, 2019.
- ZHENG, J. X. et al. Biofilm formation in Klebsiella pneumoniae bacteremia strains was found to be associated with CC23 and the presence of wcaG. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 8, n. FEB, 2018.

6. CONCLUSÃO

- As técnicas que foram utilizadas no presente trabalho mostraram-se satisfatórias para identificação dos micro-organismos investigados;
- Os diferentes perfis de resistência apresentados pelos os isolados demonstram a capacidade de adaptação e revelam a ineficiência terapêutica das infecções causadas por eles;
- A frequência em diversos setores hospitalares demonstra o número crescente de disseminação nos hospitais do Recife-PE. Esse dado é bastante preocupante, pois demonstra a inexistência ou ineficiência das ações de vigilância e monitoramento para disseminação de bactérias resistentes no ambiente hospitalar;
- No presente estudo não foi possível correlacionar o perfil de resistência com a capacidade de formação de biofilme, indicando que essa capacidade deve estar relacionada com características intrínseca dos isolados;
- Embora alguns compostos fenólicos se comportaram de maneira dúbia, alguns mostraram-se ser eficientes no combate a isolados de *K. pneumoniae* MDR. Sendo assim, um possível alternativa terapêutica frente a isolados MRDs.
- Neste trabalho, pode-se observar um ineditismo em relação a um dos compostos testados (Ácido trans-ferulico) em biofilm de *K. pneumoniae*.