



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO – UNIRIO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE – CCBS
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA E PARASITOLOGIA – DMP
DISCIPLINA DE MICROBIOLOGIA

PRISCILA MARTINS SILVA

INFLUÊNCIA DE CONCENTRAÇÕES SUBINIBITÓRIAS DO DICLOFENACO DE
SÓDIO NA PRODUÇÃO DE BIOFILME POR *Staphylococcus aureus*

RIO DE JANEIRO

2019



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO – UNIRIO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE – CCBS
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA E PARASITOLOGIA – DMP
DISCIPLINA DE MICROBIOLOGIA

PRISCILA MARTINS SILVA

INFLUÊNCIA DE CONCENTRAÇÕES SUBINIBITÓRIAS DO DICLOFENACO DE
SÓDIO NA PRODUÇÃO DE BIOFILME POR *Staphylococcus aureus*

Monografia apresentada ao Curso de Biomedicina da Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro como parte dos requisitos necessários à obtenção do Grau de Bacharel em Biomedicina, na área de Microbiologia.

Orientador: Dr. Agostinho Alves de Lima e Silva

RIO DE JANEIRO

2019

Catálogo informatizado pelo(a) autor(a)

S 586 Silva, Priscila Martins
Influência de concentrações subinibitórias do
diclofenaco de sódio na produção de biofilme por
Staphylococcus aureus / Priscila Martins Silva. --
Rio de Janeiro, 2019.
80

Orientador: Agostinho Alves de Lima e Silva.
Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) -
Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro,
Graduação em Biomedicina, 2019.

1. Biofilme. 2. Staphylococcus aureus. 3.
Diclofenaco de Sódio. 4. "Não-antibiótico". 5.
Atividade antibacteriana. I. Silva, Agostinho
Alves de Lima e , orient. II. Título.

PRISCILA MARTINS SILVA

INFLUÊNCIA DE CONCENTRAÇÕES SUBINIBITÓRIAS DO DICLOFENACO DE
SÓDIO NA PRODUÇÃO DE BIOFILME POR *Staphylococcus aureus*

Monografia apresentada ao Curso de Biomedicina da Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro como parte dos requisitos necessários à obtenção do Grau de Bacharel em Biomedicina, na área de Microbiologia.

Aprovado em: _____ de 2019.

Banca Examinadora:

Prof. Agostinho Alves de Lima e Silva (Orientador)

Prof. Carmen Soares de Meirelles Saramago

Prof. Marco Aurélio Peregrino da Silva

Prof. Renato Geraldo da Silva Filho

AGRADECIMENTOS

À Deus, por me amar e sempre estar presente me guiando e abençoando com saúde, oportunidades, pessoas que sei que posso contar sempre que precisar.

Aos meus pais, por sempre me apoiarem em minhas escolhas, por todo o esforço que fizeram ao longo da vida, para que eu pudesse estudar e correr atrás dos meus sonhos.

Ao meu orientador Prof. Dr. Agostinho, por ter me aceitado como aluna de iniciação científica, pela orientação e paciência durante esses dois anos, e por me ensinar tudo de microbiologia que eu sei.

Ao professor Renato por ter me acompanhando nas extrações de RNA, por toda a paciência e empenho para descobrir o que estava acontecendo quando não estava dando mais certo.

Aos meus amigos, que me deram apoio ao longo dessa jornada. Em especial à minha turma que foi unida em todos os momentos desde o começo da faculdade e sempre se apoiou.

Aos integrantes do Momentos, que me ajudaram tanto nas questões acadêmicas quanto nos momentos que eu precisava relaxar e esquecer um pouco a faculdade.

À Luana e Milena, por me apoiarem e incentivarem, por me escutarem quando eu precisava desabafar e me incentivarem a ficar calma que tudo daria certo.

RESUMO

O *Staphylococcus aureus* é um importante agente causador de doenças na comunidade e no ambiente hospitalar. A formação de biofilme é um dos importantes fatores ligados à virulência dessa bactéria. A produção de biofilme, quando relacionada à utilização de dispositivos de implantes médicos, favorece a colonização do patógeno, além de protegê-lo da ação de antimicrobianos e da resposta imune do hospedeiro. O diclofenaco de sódio é um dos anti-inflamatórios não-esteroidais mais prescritos, e embora não a seja sua finalidade primária de uso, apresenta atividade antibacteriana de amplo espectro. O objetivo deste estudo foi avaliar o nível de efeito antibacteriano dessa droga contra amostras de *S. aureus*, e se suas concentrações subinibitórias (Sub-CMIs) podem induzir a produção de biofilme, bem como a natureza do biofilme produzido. Adicionalmente, foram investigados os efeitos da combinação do diclofenaco com glicose, NaCl e Sub-CMIs de rifampicina. A investigação da produção de biofilme foi realizada pela técnica da placa de microtitulação. Os resultados mostraram que a concentração mínima inibitória do diclofenaco para 50 amostras de *S. aureus* (25 de portadores e 25 clínicas) situou-se entre 200 e 400 µg/mL, enquanto a mínima bactericida foi maior que 800 µg/mL. A pesquisa de produção de biofilme em TSB sem diclofenaco para 40 amostras de *S. aureus* (20 clínicas e 20 de portadores) foi positiva somente para 4 isolados (2 de portadores e 2 clínicos). Nas amostras restantes, foi observado que em 14 (7 clínicas e 7 de portadores), Sub-CMIs do diclofenaco induziram a produção de biofilme, sendo que na concentração de 50 µg/mL a indução ocorreu em todos os isolados deste grupo. Porém, nessa concentração a indução de biofilme foi acompanhada de uma redução do crescimento bacteriano que variou de 23,8 a 58,1%. Em um dos isolados, a indução de biofilme ocorreu em concentrações muito baixas de diclofenaco (1,5 e 3,0 µg/mL). Todos os biofilmes induzidos foram de natureza não-polissacarídica. Em três de quatro amostras positivas para indução de biofilme pelo diclofenaco, Sub-CMIs de rifampicina induziram forte produção de biofilme polissacarídico, tanto isoladamente quanto em combinação com diclofenaco. NaCl também induziu biofilme polissacarídico em duas amostras, qual foi convertido em não-polissacarídico quando esse sal foi combinado ao diclofenaco. Na quarta amostra o NaCl induziu biofilme não-polissacarídico, tanto isoladamente quanto na combinação com o diclofenaco. Para a glicose, em ambas as situações, todos os quatro isolados estudados apresentaram

biofilme não-polissacarídico. Imagens de microscopia eletrônica de varredura mostraram o biofilme diclofenaco-induzido com uma matriz muito discreta, compatível com sua composição não-polissacarídica.

Palavras-chave: *Staphylococcus aureus*, biofilme, diclofenaco de sódio, “não-antibiótico”, atividade antibacteriana

ABSTRACT

Staphylococcus aureus is an important agent of diseases in the community and hospital environment. Biofilm formation is one of the important factors related to the virulence of this bacterium. The biofilm formation, when related to the use of medical implant devices, favors the colonization of the pathogen, besides protecting it from the action of antimicrobial and immune response of the host. Sodium diclofenac is one of the most commonly prescribed non-steroidal anti-inflammatory drugs, and although not being its primary purpose of use, it also has broad spectrum antibacterial activity. The objective of this study was to analyze the level of antibacterial effect of this drug against *S. aureus* strains, and whether or not its sub inhibitory concentrations (Sub-MICs) may induce biofilm production, as well as the nature of the biofilm produced. Additionally, the effects of the combination of diclofenac with glucose, NaCl and rifampicin Sub-CMIs were investigated. The biofilm production research was performed by the microtiter plate technique. The results showed that the minimum inhibitory concentration of diclofenac for 50 *S. aureus* isolates (25 clinical and 25 non-clinical) ranged from 200 to 400 µg / mL, while the minimum bactericidal concentration was greater than 800 µg / mL. The biofilm production research in TSB without diclofenac for 40 *S. aureus* strains (20 clinical and 20 non-clinical) was positive for only 4 isolates (2 clinical and 2 non-clinical). Among the remaining strains, it was observed that in 14 (7 clinical and 7 non-clinical) diclofenac Sub-MICs induced biofilm production, and at 50 µg / mL the induction occurred in all isolates of this group. However, at this concentration the biofilm induction was accompanied by a reduction of bacterial growth ranging from 23.8 to 58.1%. In one of the isolates, biofilm induction occurred at very low concentrations of diclofenac (1.5 and 3.0 µg / mL). All biofilms induced were of non-polysaccharide nature. In three of four strains induced for biofilm production by diclofenac, rifampicin sub-MICs induced strong polysaccharide biofilm production, either alone or in combination with diclofenac. NaCl also induced polysaccharide biofilm in two isolates, which was converted to non-polysaccharide when this salt was combined with diclofenac. In the fourth isolate NaCl induced non-polysaccharide biofilm, both alone and in combination with diclofenac. For glucose, in both situations, all four isolates studied presented non-polysaccharide biofilm. Scanning electron microscopy images showed the diclofenac-induced biofilm with a very discrete matrix, compatible with its non-polysaccharide composition.

Keywords: *Staphylococcus aureus*, biofilm, diclofenac sodium, “non-antibiotic”, antibacterial activity

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Etapas da formação do biofilme bacteriano	22
Figura 2 - Esquema da síntese de PIA pelas proteínas estruturais do operon ica	23
Figura 3 - Cascata do Ácido Araquidônico	28
Figura 4 - Fórmula estrutural do diclofenaco de sódio	29
Figura 5 - Produção de biofilme da amostra SA50 na presença de baixas concentrações de diclofenaco	43
Figura 6 - Composição do biofilme produzido pela amostra SA12 na presença de concentrações subinibitórias de diclofenaco e rifampicina.....	46
Figura 7 - Composição do biofilme produzido pela amostra B03 na presença de concentrações subinibitórias de diclofenaco e rifampicina.....	46
Figura 8 - Composição do biofilme produzido pela amostra SA50 na presença de concentrações subinibitórias de diclofenaco e rifampicina.....	47
Figura 9 – Composição do biofilme produzido pela amostra B03 na presença de 50 µg/mL de diclofenaco e NaCl (3%).....	48
Figura 10 - Composição do biofilme produzido pela amostra SA50 na presença de 50 µg/mL de diclofenaco e NaCl (3%).....	48
Figura 11 - Composição do biofilme produzido pela amostra SA39 na presença de 50 µg/mL de diclofenaco e NaCl (3%).....	49
Figura 12 - Composição do biofilme produzido pela amostra SA12 na presença de 50 µg/mL de diclofenaco e glicose (1%).....	49
Figura 13 - Composição do biofilme produzido pela amostra B03 na presença de 50 µg/mL de diclofenaco e glicose (1%).....	50
Figura 14 - Composição do biofilme produzido pela amostra SA50 na presença de 50 µg/mL de diclofenaco e glicose (1%).....	50

Figura 15 - Composição do biofilme produzido pela amostra B03 na presença de 50 µg/mL de diclofenaco e glicose (1%).....	51
Figura 16 - Microscopia Eletrônica de Varredura da amostra B03 crescida em TSB sem e com diclofenaco.....	52
Figura 17 - Microscopia Eletrônica de Varredura da amostra SA39 crescida em TSB sem e com diclofenaco.....	52
Figura 18: Microscopia Eletrônica de Varredura da amostra SA39 crescida em TSB sem e com diclofenaco.....	52

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Classificação das Amostras Quanto aos Valores de DO _{eb}	37
Tabela 2 - CMI, CMB e tipo de biofilme induzido pelo diclofenaco de sódio em amostras de portadores de <i>S. aureus</i>	42
Tabela 3 - CMI, CMB e tipo de biofilme induzido pelo diclofenaco de sódio em amostras clínicas de <i>S. aureus</i>	42
Tabela 4 - Taxas de redução dos valores de densidade óptica do crescimento (DO _g) de amostras de <i>S. aureus</i> de portadores em TSB com diclofenaco em relação ao controle sem a droga.....	44
Tabela 5 - Taxas de redução dos valores de densidade óptica de crescimento (DO _g) de amostras clínicas de <i>S. aureus</i> em TSB com diclofenaco em relação ao controle sem a droga	44

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
1.1	INFECÇÕES RELACIONADAS À ASSISTÊNCIA EM SAÚDE (IRAS)	15
1.2	Staphylococcus aureus	16
1.3	BIOFILME	20
1.3.1	FORMAÇÃO DE BIOFILME POR <i>S. aureus</i>	21
1.3.2	FATORES QUE INFLUENCIAM NA FORMAÇÃO DE BIOFILME	24
1.3.3	ATUAÇÃO DE REGULADORES GENÉTICOS NA FORMAÇÃO DE BIOFILME DE <i>S. aureus</i>	25
1.4	MÉTODOS DE ESTUDO DE BIOFILME.....	26
1.5	EFEITOS DO “NÃO-ANTIBIÓTICO” DICLOFENACO DE SÓDIO SOBRE BACTÉRIAS.....	28
2	OBJETIVOS	33
2.1	OBJETIVO GERAL	33
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	33
3	METODOLOGIA.....	34
3.1	AMOSTRAGEM BACTERIANA	34
3.2	DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO MÍNIMA INIBITÓRIA (CMI) E DA CONCENTRAÇÃO MÍNIMA BACTERICIDA (CMB) DO DICLOFENACO DE SÓDIO	34
3.3	TRIAGEM PARA IDENTIFICAÇÃO DAS AMOSTRAS DE <i>S. aureus</i> NATURALMENTE PRODUTORAS DE BIOFILME EM TSB.....	35
3.4	EFEITO DO DICLOFENACO NA INDUÇÃO DA PRODUÇÃO DE BIOFILME EM AMOSTRAS DE <i>S. aureus</i>	37
3.5	CLASSIFICAÇÃO DO BIOFILME INDUZIDO PELO DICLOFENACO COMO POLISSACARÍDO OU NÃO-POLISSACARÍDICO.....	37
3.6	DETERMINAÇÃO DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA DA MATRIZ DO BIOFILME EM AMOSTRAS DE <i>S. aureus</i> CRESCIDAS EM MEIO COM DICLOFENACO	

ASSOCIADO A OUTRAS SUBSTÂNCIAS COM POTENCIAL CAPACIDADE DE INDUÇÃO DA PRODUÇÃO DE BIOFILME	39
3.7 VISUALIZAÇÃO DO BIOFILME INDUZIDO NA PRESENÇA DE DICLOFENACO DE SÓDIO ATRAVÉS DE MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA	40
4 RESULTADOS	41
4.1 AVALIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO MÍNIMA INIBITÓRIA DO DICLOFENACO DE SÓDIO PARA AS AMOSTRAS DE <i>S. aureus</i>	41
4.2 TRIAGEM DAS AMOSTRAS PRODUTORAS DE BIOFILME EM TSB, AVALIAÇÃO DO EFEITO DE CONCENTRAÇÕES SUBINIBITÓRIAS DO DICLOFENACO NA INDUÇÃO DA PRODUÇÃO DE BIOFILME, E COMPOSIÇÃO DO BIOFILME INDUZIDO.....	41
4.3 AVALIAÇÃO DO NÍVEL E COMPOSIÇÃO DO BIOFILME INDUZIDO PELO DICLOFENACO, QUANDO ASSOCIADO A GLICOSE, NA CL E CONCENTRAÇÕES SUBINIBITÓRIAS DE RIFAMPICINA.....	45
4.4 ANÁLISE DA ESTRUTURA DO BIOFILME INDUZIDO PELO DICLOFENACO EM DUAS AMOSTRAS DE <i>S. aureus</i> , MEDIANTE ESTUDO DE MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA.....	51
5 DISCUSSÃO	53
6 CONCLUSÕES	63
REFERÊNCIAS.....	65
APÊNDICES.....	78
ANEXOS	80

1 INTRODUÇÃO

1.1 INFECÇÕES RELACIONADAS À ASSISTÊNCIA EM SAÚDE (IRAS)

Atualmente o termo IRAS é usado em substituição a Infecção Hospitalar ou Infecção Nosocomial, e é empregado para definir infecções que o paciente adquira a partir da admissão em unidade hospitalar ou outros locais de atenção à saúde. Tais infecções estão ausentes ou em incubação no momento da admissão do paciente, e podem se manifestar durante a internação ou após a alta, desde que possa ser relacionada a algum procedimento exercido ao longo da internação. As IRAS geram maior morbidade e mortalidade em pacientes imunocomprometidos, pós-cirúrgicos, com extensas queimaduras e aqueles submetidos a cuidados em unidade de terapia intensiva (WHO, 2011). Essas infecções determinam um forte impacto na duração da internação e nos custos para o sistema de saúde (ALVIM; SANTOS, 2017; PADOVEZE; FORTALEZA, 2014).

As IRAS são consideradas as complicações mais comuns que afetam os pacientes hospitalizados, ocorrendo em 5 a 15% das internações (WHO, 2009a; 2009b). O percentual sobe para cerca de 50%, se considerarmos os pacientes internados em Unidades de Terapia Intensiva (VINCENT et al., 2009). Nos países desenvolvidos a incidência é de 3,5 a 9,1% (WHO, 2009a; 2009b), enquanto nos países em desenvolvimento apresenta valores expressivamente mais altos (PADOVEZE; FORTALEZA, 2014).

Uma variedade de fatores de risco predispõe para a ocorrência de IRAS, incluindo a utilização de dispositivos invasivos (cateter venoso, cateter urinário, tubo orotraqueal), procedimentos cirúrgicos, injeções, contaminação do ambiente de cuidados da saúde, transmissão de patógenos entre pacientes e profissionais de saúde e uso excessivo ou inadequado de antibióticos. Os principais sítios de IRAS envolvem trato urinário, sítio cirúrgico, corrente sanguínea, trato respiratório inferior e trato digestório (CDC, 2015; SCOTT, 2009). No caso de IRAS associadas ao uso de dispositivos invasivos, a colonização bacteriana no sítio do dispositivo implantado é favorecida para as amostras produtoras de biofilme, o que confere adicionalmente ao patógeno proteção contra a ação do sistema imune do hospedeiro e da ação de antimicrobianos (OTTO, 2013).

Staphylococcus aureus, *Staphylococcus epidermidis*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas* spp são exemplos de micro-organismos que frequentemente são encontrados como agentes de IRAS (GILDO et al., 2018).

1.2 *Staphylococcus aureus*

As bactérias do gênero *Staphylococcus* são Gram positivas, se assemelham morfológicamente entre si por serem esféricas, medir de 0,5 a 1,5 µm de diâmetro, e por não possuírem endosporos. As células comumente encontram-se agregadas em um agrupamento que lembra cachos de uva, porém em material clínico não é incomum a presença de células unitárias ou em pequenos grupos (MURRAY; ROSENTHAL; PFALLER, 2009; TAYLOR; UNAKAL, 2018). São anaeróbias facultativas, imóveis, catalase positivas e são halotolerantes (toleram altas concentrações de NaCl) (MURRAY; ROSENTHAL; PFALLER, 2009).

O gênero *Staphylococcus* consiste de 47 espécies e 23 subespécies. Destes, 38 cumprem a categorização de espécies negativas para a enzima coagulase, sendo que *S. schleifer* inclui tanto subespécies negativas (*S. schleiferi* subsp. *Schleiferi*) como positivas para coagulase (*S. schleiferi* subsp. *coagulanos*). Várias espécies do gênero são membros da microbiota humana (BECKER; HEILMANN; PETERS, 2014)

S. aureus é o principal patógeno do gênero, e se diferencia de outras espécies, entre outros aspectos, por ser coagulase positivo e apresentar colônias com pigmentação amarela. Sua identificação pode ser feita por testes bioquímicos como a pesquisa de coagulase, proteína A e nuclease termoestável. Seu isolamento pode ser feito por semeadura em meio seletivo indicador como o Ágar Manitol Salgado, devido a presença de NaCl em alta concentração (TAYLOR; UNAKAL, 2018).

Testes genéticos como reação em cadeia da polimerase (PCR), eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE) e hibridização fluorescente *in situ* (FISH) também podem ser utilizados para diferenciar *S. aureus* dos estafilococos coagulase negativos (MARTINEAU et al., 1998; MURRAY; ROSENTHAL; PFALLER, 2009; YAN et al., 2012).

Apesar de estar presente microbiota humana, *S. aureus* é também uma das bactérias patogênicas mais importantes. É encontrada frequentemente nas cavidades nasais, e o percentual de portadores varia entre 30 e 50% da população, estando

presente com maior frequência em membros da equipe hospitalar (TRABULSI; ALTERTHUM, 2008).

Além de seu potencial para causar uma grande diversidade de infecções, um fator que contribui para aumentar a importância do *S. aureus* como patógeno é a sua multirresistência a antimicrobianos, sobretudo nas amostras denominadas MRSA (*S. aureus* resistentes a meticilina). A emergência destas amostras se deu em 1961 na Inglaterra, disseminando-se posteriormente para todo o planeta como um dos principais agentes de infecções hospitalares. Na Inglaterra, esse patógeno foi apontado como responsável por 42% das bacteremias de causa hospitalar (CASEY; LAMBERT; ELLIOTT, 2007).

A resistência a meticilina das amostras MRSA se estende a outros β -lactâmicos semi-sintéticos como a oxacilina, e é determinada pela presença do gene *mecA*, que codifica uma proteína denominada PBP2a. Esta proteína apresenta baixa afinidade de ligação a antibióticos β -lactâmicos. O gene *mecA* é parte de um elemento genético móvel, denominado "cassete cromossômico estafilocócico (SCC) *mec*", o qual favorece a sua transmissão intra-espécies e inter-espécies (GORDON; LOWY, 2008; WISPLINGHOFF et al., 2003). A PBP2a apresenta reduzida afinidade de ligação a toda a classe de antibióticos beta-lactâmicos, incluindo penicilinas, cefalosporinas e carbapenemas, exceto os beta-lactâmicos ceftarolina e ceftobiprole, recentemente aprovados (BOSHIWI; UDO, 2018).

Recentemente foi descrito em *S. aureus* um novo mecanismo de resistência à meticilina envolvendo o gene *mecC*, um homólogo do gene *mecA*. Ele foi inicialmente designado *mecA*_{Iga251}, e compartilha 69% de homologia de nucleotídeos com o *mecA*. Amostras MRSA portadoras de *mecC* tem sido isoladas de hospedeiros humanos e animais. A detecção de *mecC* no laboratório de diagnóstico pode ser problemática porque, embora o método de difusão de disco usando cefoxitina identifique corretamente o isolado como MRSA, o teste de PCR para *mecA* ou aglutinação para PBP2a falha em detectar *mecC*. Em testes de sensibilidade, usando cefoxitina e oxacilina, os isolados *mecA*-MRSA mostram resistência a ambos os antibióticos, enquanto a maioria das amostras *mecC*-MRSA irá expressar resistência apenas à cefoxitina (BOSWIHI; UDO, 2018).

As amostras MRSA caracterizavam-se até a década de 1990 por raramente serem causa de infecções não hospitalares. Esse quadro mudou no início dos anos

90, com o surgimento de um surto causado por *S. aureus* resistente a metilina na Austrália, sem que os pacientes tivessem contato com o ambiente hospitalar (GORDON; LOWY, 2008; WISPLINGHOFF et al., 2003). Estas amostras foram denominadas de CA-MRSA (MRSA adquiridas na comunidade) e atualmente tem sido causa comum de infecções. As CA-MRSA causam mais frequentemente, infecções de pele e pneumonia necrotizante, ambas associadas à presença de uma citolisina denominada leucocidina Panton-Valentine, estando esta comumente ausente nas amostras hospitalares. As CA-MRSA carregam o SCCmec IV, de tamanho menor do que aquele encontrado nas amostras HA-MRSA (MRSA adquiridas em ambiente hospitalar) (VANDENESCH et al., 2003). A presença do SCCmec IV confere resistência a metilina sem, no entanto, determinar multirresistência a antibióticos, como comumente ocorre nas HA-MRSA, que possuem SCCmec II ou III (BOYLE-VAVRA; DAUM, 2007).

As infecções causadas por *S. aureus* podem ser superficiais, profundas ou podem estar associadas a quadros tóxicos. Abscessos cutâneos e infecções de feridas são exemplos de infecções superficiais, já as sistêmicas incluem bacteremia, pneumonia, osteomielite e endocardite, enquanto os quadros tóxicos envolvem intoxicação alimentar, Síndrome do Choque Tóxico e Síndrome da Pele Escaldada (TRABULSI, LUIZ RACHID; ALTERTHUM, 2008).

A grande diversidade de doenças causadas pelo *S. aureus* é em parte favorecida pela quantidade de fatores de virulência que este micro-organismo pode expressar, como diferentes tipos de adesinas, enzimas (ex: hialuronidase, fibrinolise, nucleases e coagulase), além de várias toxinas. Muitos dos seus produtos de virulência são estruturais, ou seja, estão ligados à parede celular. Tais produtos podem exercer importante papel na interação da bactéria com o hospedeiro na etapa inicial de colonização, enquanto outros estão associados a mecanismos para a evasão de defesas do hospedeiro, ou à modulação da resposta imune, de modo a beneficiar a sobrevivência do micro-organismo. (BIEN; SOKOLOVA; BOZKO, 2011).

Na etapa inicial de implantação do patógeno nos tecidos do hospedeiro pode-se destacar um grupo de adesinas proteicas denominado de MSCRAMM (*Microbial Surface Components Recognizing Adhesive Matrix Molecules*). Estes grupamentos moleculares se ligam a diferentes proteínas da matriz extracelular e do plasma (VILA; SORIANO; MENSA, 2008), tais como fibrinogênio, laminina, elastina,

colágeno, fibronectina e sialoproteína. São exemplos de MSCRAMM proteínas como Fib (liga-se ao fibrinogênio), Ebp (ligação à elastina), um conjunto de proteínas conhecidas como família Sdr (ligam-se a fibrinogênio) (MCCREA et al., 2000; ROGERS; FEY; RUPP, 2009), Eno (liga-se à laminina), Cna (liga-se ao colágeno), FnBPA / FnBPB (ligam-se à fibronectina) e ClfA / ClfB (ligam-se ao fibrinogênio) (ATSHAN et al., 2012).

Entre os fatores de virulência que estão relacionados à evasão de defesas do hospedeiro destaca-se a proteína A (SpA), que se encontra fixada covalentemente à parede celular, e que possui a propriedade de se ligar à porção Fc de IgG, tornando a bactéria menos susceptível à fagocitose (MOKS et al., 1986).

S. aureus produz também uma ampla gama de produtos solúveis ligados à virulência, como as Toxinas Esfoliativas, Toxina-1 (TSST-1) e diferentes tipos antigênicos de enterotoxinas. As Toxinas Esfoliativas atuam como enzimas serino-proteases, clivando desmosossomos e formando ampolas intra-epidérmicas, o que gera a formação de grandes bolhas cutâneas contendo líquido claro. Essas toxinas exercem papel central na patogenia da doença denominada Síndrome da Pele Escaldada (OTTO, 2014). Outro tipo de toxina do *S. aureus*, a TSST-1 determina a ocorrência de uma doença de acometimento multisistêmico, conhecida como Síndrome do Choque Tóxico. Ela atua como superantígeno, se ligando simultaneamente a um receptor de célula T e a uma molécula MHC II na superfície de uma célula apresentadora de antígeno, sem processamento, o que determina acentuada liberação de citocinas por macrófagos e células T (OTTO, 2014).

Também exemplos de superantígenos, mas diferenciadas pelo fato de não atravessarem mucosas, as enterotoxinas são responsáveis pelos quadros de Intoxicação Alimentar Estafilocócica, uma doença transmitida por alimentos (DTA) que tipicamente envolve intensa atividade emética (HENNEKINNE; DE BUYSER; DRAGACCI, 2012; OTTO, 2014). Como mencionado anteriormente, nas amostras MRSA podemos encontrar a citotoxina denominada leucocidina de Pantón-Valentine (PVL), que afeta neutrófilos, determinando a formação de poros na membrana celular, e levando à lise de leucócitos, inflamação grave e intensa necrose tissular (LÖFFLER et al., 2010). Por fim, destaca-se ainda como importante fator ligado à virulência do *S. aureus* a sua capacidade de formar biofilmes.

1.3 BIOFILME

Os biofilmes são compostos por células bacterianas envoltas por uma matriz polimérica extracelular autoproduzida, que pode estar aderida a uma superfície inerte ou aderida a tecidos. As bactérias no biofilme apresentam um fenótipo alterado em relação à taxa de crescimento e transcrição gênica das bactérias planctônicas (DONLAN; COSTERTON, 2002; DUNNE, 2002). Além disso, são refratárias a resposta imune do hospedeiro e a antimicrobianos (REHAB; SHEREIN, 2016).

Ao contrário do que ocorre com as células em estado planctônico, que apresentam um desempenho fisiológico e metabólico celular normal, as células presentes no biofilme apresentam uma atividade reduzida, em termos de divisão celular, síntese proteica e replicação do DNA. Este metabolismo em estado de quase repouso é um fator que também contribui para o processo de persistência aos antimicrobianos (MAH; O'TOOLE, 2001). Fatores como a limitação de nutrientes, diminuição do gradiente de oxigênio e acúmulo de metabolitos tóxicos que ocorrem principalmente nas regiões mais profundas do biofilme pode desacelerar o crescimento bacteriano e alterar a expressão gênica, dificultando a ação de antimicrobianos (DONLAN; COSTERTON, 2002).

Lentes de contatos, dispositivos de implantes, pulmões, epitélio vaginal e dentes são alguns exemplos de superfícies onde os biofilmes podem se formar (COSTERTON et al., 2003; DUNNE, 2002; PERILLI et al., 2000). O biofilme, quando associado a dispositivos de implantes, é difícil de erradicar e envolve frequentemente intervenção cirúrgica para remoção do dispositivo e terapia agressiva com antimicrobianos. Jacqueline e Caillon (2014) sugerem o uso de terapia alternativa como inibidores do *quorum sensing* (QS), bacteriófagos, e moléculas específicas anti-biofilme associadas aos antimicrobianos convencionais.

Segundo Smith e colaboradores (2008), em cerca de 65% das infecções bacterianas pode-se observar a sua presença. A matriz extracelular produzida no biofilme oferece proteção contra agentes antimicrobianos e contra os mecanismos de defesa do hospedeiro, representando uma fonte permanente para a ocorrência de bacteremias (KIM; HACKER; LEE, 2008; VUONG et al., 2004), e dificultando ou impedindo a erradicação da infecção (ROHDE et al., 2007).

1.3.1 FORMAÇÃO DE BIOFILME POR *S. aureus*

Duas etapas principais fazem parte da formação do biofilme. A primeira envolve a aderência bacteriana ao tecido do hospedeiro ou à superfície de um dispositivo médico implantado, evento este que envolve a participação de fatores inespecíficos (físico-químicos) e adesinas específicas (PALMER; FLINT; BROOKS, 2007; APARNA; YADAV, 2008)

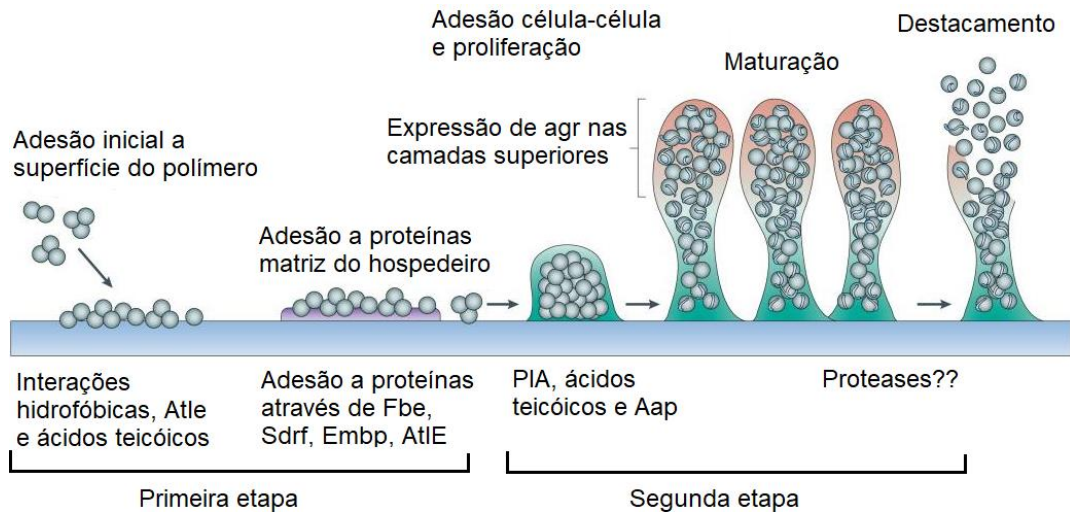
Entre os fenômenos físico-químicos que participam na adesão bacteriana a superfícies de biomateriais destacam-se aqueles relacionados à própria superfície do material, como sua hidrofobicidade, forças de Van der Waals e forças eletrostáticas (ARCIOLA et al., 2012).

Algumas proteínas da parede celular podem atuar juntamente com a hidrofobicidade, promovendo a ligação inicial aos biomateriais. São exemplos as autolisinas bifuncionais, como AtlA, que além de sua ação enzimática na divisão celular e na lise bacteriana, funcionam também como adesinas (ARCIOLA et al., 2012).

Poucas horas após a colocação de um dispositivo médico, observa-se que sua superfície já se apresenta revestida por proteínas plasmáticas e da matriz extracelular do hospedeiro, tais como fibronectina, fibrinogênio, vitronectina, colágeno, laminina e elastina (GUO et al., 2007; KREPSKY et al., 2003). Essas proteínas podem funcionar como receptores para a ligação das MSCRAMM do *Staphylococcus*, (VILA; SORIANO; MENSA, 2008).

Após a adesão inicial inicia-se a segunda etapa da formação do biofilme, caracterizada pela acumulação da população bacteriana, formando extensos agregados, os quais são promovidos por mecanismos de aderência intercelular.

Figura 1 - Etapas da formação do biofilme bacteriano



Fonte: adaptado de OTTO (2009).

A aderência intercelular é mediada principalmente pelo polissacarídeo de superfície poli- β (1,6)-N-acetil-D-glicosamina (PNAG), denominado Adesina Polissacarídica Intercelular (PIA - *Polysaccharide Intercellular Adhesin*) (IZANO et al., 2008).

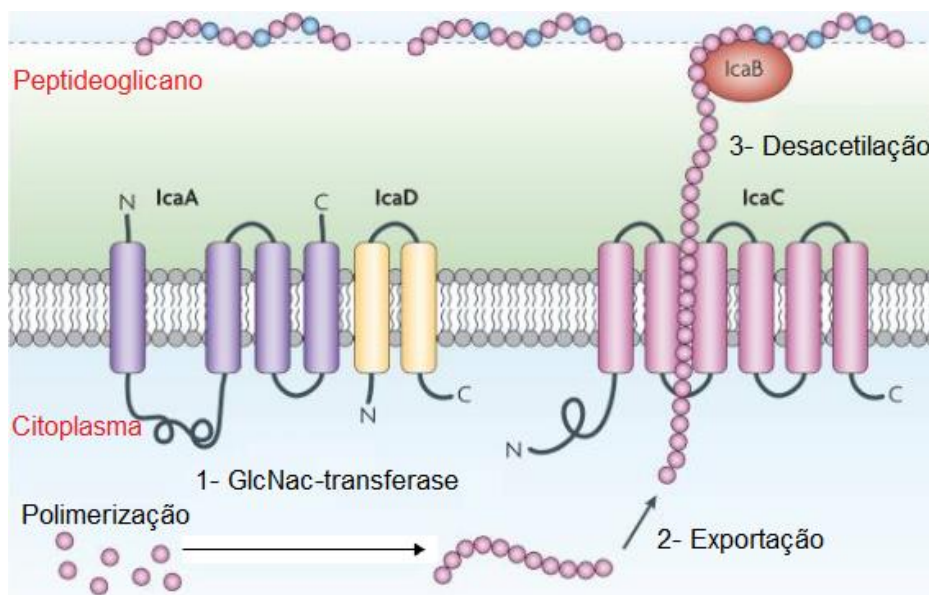
A produção de PIA é realizada por produtos do *locus* cromossomal *ica*, que é composto por quatro genes de aderência intercelular (*icaA*, *icaD*, *icaB* e *icaC*). Estes genes estão organizados no operon *icaADBC* (MATEO et al., 2008; FEY et al., 1999). A produção ou não de PIA é regulada pelo gene regulador denominado *icaR*. A homologia da sequência dos genes de *ica* entre *S. aureus* e *S. epidermidis* varia de 59 a 78% (CRAMTON et al., 1999).

O gene *icaA* codifica a síntese da proteína IcaA, uma enzima N-acetilglicosaminatransferase que catalisa a síntese de poli- β (1,6)-N-acetil-D-glicosamina, a partir de UDP-N-acetil-D-glicosamina. Se o gene *icaA* é expresso isoladamente, o resultado é uma atividade enzimática baixa. Porém, quando co-expresso com o gene *icaD*, que codifica para a transferase IcaD, ocorre um expressivo aumento da atividade de transferase (ARCIOLA et al., 2012). Os oligômeros de N-acetil-D-glicosamina produzidos por *icaAD* apresentam no máximo 20 resíduos, mas quando este gene é co-expresso com *icaC* são sintetizados longos resíduos do polímero (GERKE et al., 1998).

Após a produção do polissacarídeo, este é então exportado através da membrana plasmática pela proteína IcaC, sob sua forma acetilada, ou seja, como uma

molécula de carga neutra. Porém, quando a proteína de superfície celular IcaB, promove a desacetilação dos resíduos de glicosamina, a PIA passa a ser carregada positivamente (GÖTZ, 2002; VUONG et al., 2004). Essa desacetilação de PIA durante a fase final de sua produção é importante, uma vez que confere carga positiva à molécula inicialmente de carga neutra. Como a superfície celular bacteriana é carregada negativamente, a PIA pode atuar como uma adesina intercelular, promovendo interações eletrostáticas, por exemplo, com ácidos teicóicos presentes na parede celular (SADOVSKAYA et al., 2005).

Figura 2 - Esquema da síntese de PIA pelas proteínas estruturais do operon *ica*



Fonte: adaptado de OTTO (2009)

A expressão do operon *icaADBC* pode ser regulada diretamente no gene *icaA*, ou através da inibição da expressão do gene *icaR*. Portanto, *icaR* é um regulador da transcrição de *ica* (OTTO, 2009) (OTTO, 2009). Esse gene é transcrito de forma divergente do operon *icaADBC*, pois a proteína IcaR codificada se liga à região promotora do operon *icaADBC*, próxima ao gene *icaA*, o que leva à repressão de sua transcrição (CONLON; HUMPHREYS; O'GARA, 2004).

Outro modo de regulação negativa da expressão do operon *ica* é pela integração da sequência de inserção *IS256* dentro do operon *ica*, o que reduz a capacidade de adesão e formação do biofilme (KIEM et al., 2004).

Existem amostras de *Staphylococcus* que tem capacidade para produzir biofilme, mas não para produzir PIA (O'GARA, 2007; IZANO et al., 2008). Nestas

amostras, portanto, o biofilme formado é do tipo *ica*-independente, e irá apresentar uma composição majoritariamente proteica (CUCARELLA et al., 2001), ou será constituído por DNA extracelular (DNAe) (QIN et al., 2007) ou ainda por ácidos teicoicos (SADOVSKAYA et al., 2005).

No caso do biofilme proteico, sua matriz é constituída principalmente por proteínas como Bap (Proteína Associada a Superfície), Aap (Proteína Associada à Acumulação) (CUCARELLA et al., 2001) e FnBPA e FnBPB (proteínas ligantes de fibrinogênio e que fazem parte da família das MSCRAMM) (HOUSTON et al., 2011; O'NEILL et al., 2008; SPEZIALE et al., 2014).

Os biofilmes *ica*-independentes constituídos por DNA extracelular (DNAe) parecem ser muito mais frequentes em *S. aureus* do que em *S. epidermidis* (IZANO et al., 2008). Neste tipo de biofilme o DNAe parece atuar de um modo análogo à PIA, contribuindo para a estrutura física do biofilme e promovendo aderência intercelular com a formação de uma rede eletrostática (DENGLER et al., 2015). Além disso, o DNAe é apontado como um dos fatores responsáveis pela aderência inicial do *Staphylococcus* a superfícies de plástico ou de vidro (ARCIOLA et al., 2012; QIN et al., 2007).

Foi demonstrado que o DNAe encontrado no biofilme de *S. epidermidis* apresenta grande similaridade com o DNA genômico, indicando que o DNA que compõe o biofilme tem sua origem na lise de células bacterianas. A autolisina AtlE parece ser o fator responsável pela liberação do DNA cromossômico para o meio extracelular (QIN et al., 2007).

1.3.2 FATORES QUE INFLUENCIAM NA FORMAÇÃO DE BIOFILME

A formação de biofilme em *Staphylococcus* é influenciada por diferentes fatores ambientais e nutricionais, tais como osmolaridade (RACHID et al., 2000; KNOBLOCK et al., 2001), glicose em concentração \geq a 1g no meio (RACHID et al., 2000, CONLON; HUMPHREYS; O'GARA, 2002), limitação da concentração de oxigênio livre (CRAMTON et al., 2001), temperatura (RACHID et al., 2000), heparina (SHANKS et al., 2005), presença de ferro (DEIGHTON; BORLAND, 1993), concentrações subinibitórias de certos antimicrobianos (RACHID et al., 2000; LIMA-E-SILVA et al.,

2017), etanol (KNOBLOCK et al., 2002) e concentrações subinibitórias de clorexidina (SILVA-FILHO, 2014).

A indução da produção de biofilme por fatores ambientais ou nutricionais é consequência, em muitos casos, da ação desses agentes como promotores de estresse, o que acarreta, mediante a ativação de diferentes vias, o aumento da expressão do operon *ica* (KNOBLOCH et al., 2001, CONLON; HUMPHREYS; O'GARA, 2002). A atividade desse operon leva à produção de biofilme com composição polissacarídica. Entretanto, fatores químicos e ambientais podem promover a estimulação da produção de biofilme também em amostras desprovidas do operon *icaADBC* (AGARWAL; JAIN, 2013).

1.3.3 ATUAÇÃO DE REGULADORES GENÉTICOS NA FORMAÇÃO DE BIOFILME DE *S. aureus*

Um dos fatores que regulam a produção de biofilme é a atividade do sistema conhecido como *quorum sensing*. Uma vez formada a comunidade microbiana, as bactérias se comunicam de modo organizado e coletivo através de um sensor de densidade populacional do QS. Este sensor induz um comportamento sincrônico das bactérias e ativa a expressão de genes de fatores de virulência, inclusive alguns relacionados com o biofilme (WATERS; BASSLER, 2005).

A regulação via *quorum sensing* parece ser feita pelo operon *agr*, composto por quatro genes (*agrD*, *agrB*, *agrC* e *agrA*) (CHEUNG, 2002; VUONG et al., 2000). A co-transcrição dos genes de *agr* leva a produção de um peptídeo auto-indutor que atua como um sinalizador quando a densidade celular atinge um patamar ideal (VUONG et al., 2000). Segundo alguns autores, para a formação de biofilme é necessário que a atividade do operon *agr* esteja reprimida. O sistema é ativado somente após a formação do biofilme, permitindo o desprendimento de células e sua disseminação quando o biofilme se torna maduro (ARCHER et al., 2011; BOLES; HORSWILL, 2008)

Além dos genes *agr*, a regulação da expressão de fatores de virulência é coordenada por outros loci genéticos, como o regulador global *sarA* que pode afetar a expressão do operon *icaADBC* (CHEUNG, 2002; TROTONDA et al., 2005). A proteína SarA pode atuar como um regulador positivo na transcrição do locus *ica* de um modo independente do gene *icaR*, ao se ligar ao promotor de *icaA* (TORMO et al., 2005), ou atuar promovendo a ativação do gene *bap*, mediante ligação ao seu

promotor, regulando assim a formação de um biofilme do tipo *ica*-independente (TROTONDA et al., 2005). A proteína *sarA* pode ainda promover a diminuição de proteases pela bactéria, determinando aumento da participação de proteínas da parede celular (FnBPA e FnBPB) na composição do biofilme proteico (O'NEILL et al., 2008).

Outro regulador global de fatores de virulência de *S. aureus*, é o *sigB*, que sinaliza para a transcrição de genes que estão envolvidos na resposta ao estresse ambiental, como os observados na condição do biofilme, (MANNA; BAYER; CHEUNG, 1998). Assim, *sigB* pode ser ativado (via ação de um regulador positivo chamado *rsbU*) por fatores como a diminuição da concentração de nutrientes, variações de pH, temperatura e alta osmolaridade. A ativação do regulador *sigB* inibe a transcrição de *icaR*, levando ao desbloqueio da transcrição do operon *icaADBC*, permitindo assim a produção de PIA e formação de biofilme (RACHID et al., 2000; CERCA; BROOKS; JEFFERSON, 2008)

A formação de biofilmes do tipo *ica*-independentes pode ser regulada ainda pelo gene *rbf* (*regulator of biofilm formation*), o qual codifica uma proteína com domínios de ligação a moléculas de DNA, em resposta a estímulos ambientais como variações nas concentrações de cloreto de sódio e glicose (LIM et al., 2004).

A presença de NaCl no meio de cultura aumenta a produção de biofilme em amostras de *S. aureus* e de Estafilococos coagulase negativos (LIM et al., 2004). Frank e Patel (2007) observaram que nas concentrações de 1 a 3% de NaCl houve aumento nos níveis de produção de biofilme por amostras de *S. aureus* e *S. epidermidis*, enquanto 73% das amostras de *S. lugdunensis* produziram mais biofilme na presença de 1 ou 2% de NaCl, o mesmo também se observando na presença de glicose. Em um ensaio de aderência ao tubo, a suplementação com glicose do TSB mostrou aumentar a aderência das amostras de *S. epidermidis* testadas, quando comparado ao TSB sem suplementação (DEIGHTON; BALKAU, 1990).

1.4 MÉTODOS DE ESTUDO DE BIOFILME

Existem diversas técnicas para determinação da produção de biofilme, as quais incluem métodos quantitativos e qualitativos. Semeadura em Agar Vermelho Congo (para biofilmes de composição polissacarídica), detecção da formação de filme em tubos de vidro ou de poliestireno, técnica da placa de microtitulação de poliestireno,

microscopia invertida, microscopia confocal e microscopia eletrônica de varredura são alguns exemplos das técnicas utilizadas (CHRISTENSEN et al., 1985; DEIGHTON; BALKAU, 1990; FREEMAN; FALKINER; KEANE, 1989; VIANA, 2016; HASSAN et al., 2011)

STEPANOVIC et al., (2007) padronizaram a metodologia utilizada para a detecção quantitativa da produção de biofilme por estafilococos. Essa padronização foi feita com o objetivo de otimizar sua detecção, ser facilmente reproduzida e permitir a comparação entre diferentes estudos. Ela é baseada em outros métodos existentes descritos na literatura, incluindo métodos qualitativos de aderência em vidro ou poliestireno (CHRISTENSEN et al., 1985). A técnica da placa de microtitulação apresenta relativa simplicidade e custo acessível, permite a obtenção de resultados quantitativos e desempenho positivo quando comparado com outros métodos. Tais fatores permitiram a consolidação dessa técnica como uma metodologia de referência para muitos investigadores que trabalham rotineiramente com biofilme (HASSAN et al., 2011, LOS et al., 2010, MATHUR et al., 2006).

Entre os métodos de estudo de biofilme com base na microscopia, podemos destacar a microscopia eletrônica de varredura e a microscopia confocal de varredura a laser. A primeira fornece uma imagem tridimensional da amostra, permitindo observar o material presente na matriz extracelular e a interação entre os microrganismos do biofilme (DORIA et al., 2015; MARQUES et al., 2007; ZOLTAI; ZOTTOLA; MCKAY, 1980). A segunda permite que biofilmes inteiramente hidratados possam ser analisados por progressivos escaneamentos a laser, em diferentes planos focais dentro da amostra. Uma análise computacional das imagens torna possível a recriação da estrutura tridimensional do biofilme. A aplicação desta técnica em combinação com determinadas técnicas fluorescentes de coloração fornece um importante e efetivo instrumento para analisar a composição e a estrutura de biofilmes *in situ*, de modo não destrutivo e em tempo real. Tal combinação permite também a análise da viabilidade e distribuição dos microrganismos dentro do biofilme (LAWRENCE; NEU, 1999).

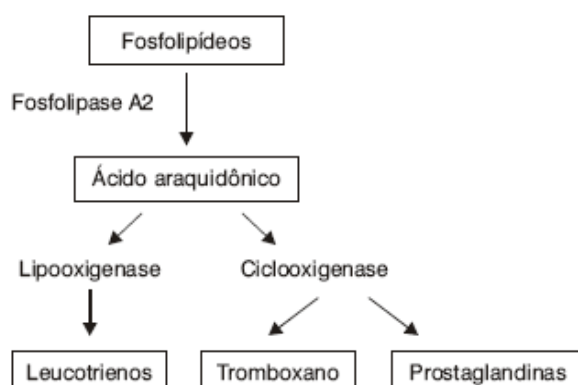
1.5 EFEITOS DO “NÃO-ANTIBIÓTICO” DICLOFENACO DE SÓDIO SOBRE BACTÉRIAS

Os anti-inflamatórios não esteroides (AINE) encontram-se entre os medicamentos mais prescritos em todo o mundo (BATLOUNI, 2010). São indicados para o tratamento de doenças reumáticas e outras doenças inflamatórias, além de serem usados também na prática médica e odontológica no controle da dor pós-cirúrgica, devido a seus efeitos analgésicos e também como antipiréticos (AL-JANABI, 2016; DARWISH et al., 2009; PROCKT et al., 2008). Estão disponíveis no mercado sob a forma de comprimidos, géis, injeções, e o diclofenaco de sódio pode ser encontrado ainda na composição de colírios para tratamento de infecções oculares, diferentemente do ácido acetilsalicílico (PERILLI et al., 2000; RANG et al., 2011).

O mecanismo de ação dos AINE ocorre principalmente através da inibição das enzimas ciclooxigenases, resultando em inibição da síntese de prostaglandinas (DARWISH et al., 2009).

A enzima fosfolipase A2 quando ativada libera ácido araquidônico no citoplasma através da degradação de fosfolipídios de membrana. As ciclooxigenases 1 e 2 (COX 1 e 2) são as principais enzimas envolvidas na síntese de prostaglandinas a partir da oxidação de ácido araquidônico, como pode ser observado na figura 2 (BATLOUNI, 2010; HILÁRIO; TERRERI; LEN, 2006). Na inflamação, as prostaglandinas estão envolvidas no aumento do fluxo sanguíneo local, elevação da temperatura corporal, dor, dentre outros (HILÁRIO; TERRERI; LEN, 2006).

Figura 3 - Cascata do Ácido Araquidônico



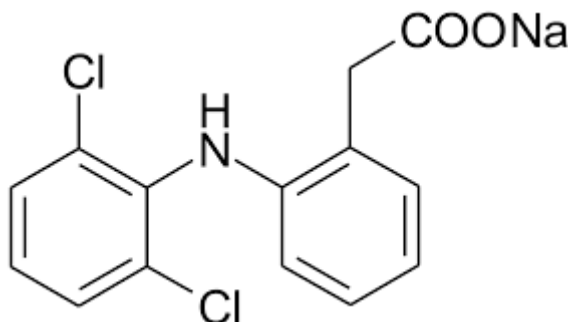
Fonte: Adaptado de Hilário; Terreri; Len, (2006)

A COX-1 é uma enzima constitutiva que está presente na maioria dos tecidos, ela é responsável pela manutenção de processos fisiológicos como por exemplo, agregação plaquetária e autorregulação do fluxo sanguíneo renal (RANG, et al 2011). A COX-2 é uma enzima induzida na presença de interleucinas, fator de necrose tumoral, fatores de crescimento e endotoxinas (DARWISH et al., 2009; RANG et al., 2011).

Os AINE não seletivos são os mais antigos, e são chamados de tradicionais ou convencionais. Os AINE que apresentam seletividade para a COX-2 são chamados COXIBEs, e foram desenvolvidos devido ao fato de COX -2 ser induzida na presença de estímulos inflamatórios e também para evitar os efeitos adversos que ocorrem pela inibição de COX 1 (BATLOUNI, 2010; HILÁRIO; TERRERI; LEN, 2006).

O diclofenaco de sódio (figura 4) é um dos AINE mais prescritos, e assim como os outros, possui efeito analgésico, antipirético e anti-inflamatório (AL-JANABI, 2016). É um derivado do ácido fenilacético, fracamente seletivo para COX-1, e apresenta seletividade para inibição de COX-2 semelhante aos coxibes(BATLOUNI, 2010; CARVALHO; CARVALHO; RIOS-SANTOS 2004) . Seu uso é indicado no tratamento de artrite reumatoide, osteoartrite, gota aguda, dor pós operatória e lesões musculoesqueléticas (RANG,. et al 2011). As concentrações plasmáticas máximas são atingidas em 2-3 horas (AL-JANABI, 2016). Este AINE pode ser fornecido como sal de sódio ou potássio, ambos com boa solubilidade em solventes como metanol e DMSO. No entanto, a maioria dos estudos envolvendo a ação do diclofenaco em bactérias foi conduzida usando sua forma sódica.

Figura 4 - Fórmula estrutural do diclofenaco de sódio



Fonte: INMETRO

Nas últimas décadas, devido ao dramático aumento e disseminação global da resistência bacteriana para inúmeros antimicrobianos de uso comum, muitos estudos têm se voltado para a investigação de drogas cuja finalidade terapêutica primária não é a de uma ação antimicrobiana, mas que poderiam ser úteis no combate a infecções. Foi demonstrado, assim, que várias classes farmacológicas de drogas que não fazem parte do grupo dos antimicrobianos tradicionais possuem maior ou menor grau de atividade antibacteriana de amplo espectro. São exemplos os neurolepticos (KRISTIANSEN, 1979); anti-histamínicos (DASTIDAR et al., 1996) e AINE (ZIMMERMANN; CURTIS, 2017; SHAH et al., 2018). Drogas com estas propriedades foram nomeadas de “não-antibióticos” por KRISTIANSEN (1992).

Entre as drogas classificadas como “não antibióticos”, as mais estudadas são AINE como o diclofenaco, ibuprofeno, indometacina e ácido acetil salicílico. Sua ação antimicrobiana abrange isolados bacterianos de diferentes espécies, além de fungos (ZIMMERMANN; CURTIS, 2017). Entre estes AINE, um que se destaca é o diclofenaco, que demonstrou atividade antibacteriana *in vitro* e *in vivo* frente a diferentes patógenos (DUTTA et al., 2007; UMARU et al., 2009; MAZUMDAR et al., 2009; PADMA; YALAVARTHY, 2015; HEGAZY, 2016). Uma ampla fonte de dados sobre a atividade inibitória desta droga sobre bactérias Gram positivas, Gram negativas e Micobactérias foi sistematizada por Lima-e-Silva; Silva (2018).

Estudos sugerem que o mecanismo de ação do diclofenaco ocorra através da inibição da síntese de DNA bacteriano (DUTTA et al., 2004). Outros mecanismos apontados envolvem alterações na permeabilidade da membrana (DARWISH et al., 2009), perturbação do mecanismo de efluxo, e transporte de íons (TYSKI, 2003).

A atividade antimicrobiana do diclofenaco foi apontada pela maioria dos autores como sendo do tipo bactericida em bactérias Gram positivas, Gram negativas e micobactérias (DASTIDAR et al., 2000; DUTTA et al., 2007; DUTTA et al., 2007; MAZUMDAR et al., 2009). Porém, Perilli et al., (2000) mostraram que a ação desta droga sobre o crescimento de *S. epidermidis* foi bacteriostática, uma vez que subculturas subsequentes restauraram as taxas normais de crescimento dos isolados.

Além de sua ação antibacteriana, quando em concentrações subinibitórias a droga pode promover profundas alterações genéticas e fisiológicas nos microrganismos. Riordan e colaboradores (2011) descreveram extensas alterações no transcriptoma de uma amostra de MRSA quando cultivada na presença de

concentrações subinibitórias (SUB-CMIs) de diclofenaco. Mudanças na expressão de centenas de genes foram observadas, incluindo aqueles associados à resistência a antimicrobianos. Foi demonstrada alteração na susceptibilidade a múltiplos antibióticos, com significativo aumento para ciprofloxacina, ofloxacina e norfloxacina, e diminuição para oxacilina e vancomicina. Para tetraciclina ou cloranfenicol não foram registradas alterações.

Em isolados de *E. coli* de infecções do trato urinário além de promover pronunciada atividade antibacteriana, a exposição sequencial dessa bactéria ao diclofenaco resultou no surgimento de mutantes com notável redução nos valores da CMI para diferentes antibióticos. A eletroforese em gel de agarose mostrou a ausência de qualquer faixa específica de plasmídeo no mutante, em contraste com o que foi observado no isolado controle (MAZUMDAR et al., 2006).

Além da ação antimicrobiana do diclofenaco, sua associação com antimicrobianos tradicionais pode resultar em atividade sinérgica inibitória ou bactericida contra diferentes patógenos bacterianos (ANNANDURAI et al., 2002; DUTTA et al.; 2004; DUTTA et al.; 2009).

Adicionalmente aos estudos sobre a atividade antibacteriana do diclofenaco, algumas investigações têm se voltado para seu efeito sobre biofilmes e outros fatores ligados a virulência bacteriana. Considera-se que AINE como o diclofenaco podem afetar negativamente a produção de biofilme mediante fatores como a redução da produção de polissacarídeo extracelular, ácidos teicoicos e proteínas, ou por alteração da hidrofobicidade da superfície celular, ou ainda mediante inibição de componentes do sistema *quórum sensing* (OPREA; MOGA, 2015).

Na maioria dos estudos de drogas com potencial atividade anti-biofilme, o objetivo é avaliar o efeito sobre biofilmes pré-formados. Essa abordagem depende da capacidade do fármaco se difundir através do biofilme para exercer seu efeito diretamente sobre o patógeno, ou de agir desintegrando o biofilme, de modo que o patógeno exposto se torne um alvo mais fácil para os antimicrobianos. Em outros estudos, no entanto, o foco investigativo está na capacidade da droga de agir durante a fase de adesão de células planctônicas a uma superfície, a fim de inibir os estágios iniciais da formação do biofilme.

Estudando um isolado clínico de *Proteus mirabilis*, Hegazy (2016) mostrou que o diclofenaco em concentrações subinibitórias não afetou expressivamente a adesão bacteriana, enquanto a formação de biofilme foi significativamente inibida nas mesmas concentrações, o que indica que a atuação dessa droga se dá em estágios mais tardios da formação de biofilme.

Mohsen et al., (2015) constataram uma maior degradação de biofilmes pré-formados por bactérias Gram negativas e *S. aureus* quando AINE como o diclofenaco e ibuprofeno foram combinados a N-acetil cisteína. A combinação de diclofenaco e ibuprofeno em concentrações subinibitórias também determinou expressiva redução na a formação de biofilme em isolados clínicos de *K. pneumoniae* e *E. coli*, ambos caracterizados previamente como fortes produtores de biofilme (BALDIRIS et al., 2016).

Por outro lado, Reśliński et al., (2015) mostraram que o diclofenaco limitou a formação de biofilme forte por isolados clínicos de *S. aureus* cultivados na superfície de uma tela de polipropileno. Entretanto, observaram que ocorreu, em relação ao controle, um aumento no percentual de amostras fracas produtoras de biofilmes.

Além de poder afetar a formação de biofilme, AINE podem influenciar a expressão de outros fatores de virulência bacteriana. Concentrações subinibitórias de diclofenaco inibiram significativamente a motilidade *swarming* e *swimming* de *P. mirabilis* isolado de lesão de pé diabético, indicando que a disseminação da infecção pode ser afetada por essa droga. Adicionalmente, foi observada uma significativa diminuição da atividade da protease, da hemolisina e da urease do microrganismo (HEGAZY, 2016).

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o efeito inibitório do diclofenaco de sódio e a atividade de concentrações subinibitórias da droga na indução da produção de biofilme por amostras de *Staphylococcus aureus* oriundas de pacientes hospitalizados e portadores.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar a CMI e CMB do diclofenaco de sódio para amostras de *S. aureus* de origem clínica e de portadores;
- Dimensionar a capacidade do diclofenaco de sódio na indução de biofilme nas amostras de *S. aureus*;
- Investigar a composição química do biofilme como polissacarídica ou não-polissacarídica;
- Avaliar o tipo de biofilme formado na presença do diclofenaco de sódio, associado a concentrações subinibitórias de rifampicina, glicose e cloreto de sódio nas amostras estudadas;
- Investigar estruturalmente, por meio de microscopia eletrônica de varredura, o biofilme induzido pelo diclofenaco de sódio;

3 METODOLOGIA

3.1 AMOSTRAGEM BACTERIANA

Neste estudo foram analisadas amostras clínicas e de portadores saudáveis de *Staphylococcus aureus*. Essas amostras pertencem à coleção de culturas do Laboratório de Biologia e Fisiologia dos Micro-organismos, localizado no Instituto Biomédico da Universidade Federal do estado do Rio de Janeiro (UNIRIO).

As amostras de portadores foram isoladas da cavidade nasal de estudantes do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde (CCBS) da UNIRIO nos anos de 2008 e 2009. A coleta dessas amostras, ocorreu mediante a assinatura do “Termo de Consentimento Livre e Esclarecido” (TCLE) (ANEXO A) pelos estudantes voluntários autorizando a coleta de material biológico e a sua utilização para fins de pesquisa.

As amostras clínicas foram isoladas de dispositivos intravasculares ou do sangue de pacientes do Hospital Federal dos Servidores do estado do Rio de Janeiro (HFSE) nos anos de 2011 e 2012, sendo o estudo aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos (CEP-HSE - nº 000.47).

As amostras foram submetidas a identificação com base em estudo morfológico, testes de catalase e coagulase, além de caracterização no sistema automatizado VITEK® 2 Systems.

As amostras foram numeradas, sendo que os isolados de portadores foram rotulados como grupo B, enquanto as amostras clínicas nomeadas como grupo SA. Os isolados foram estocados em freezer a -20°C, em tubos contendo Caldo Infusão de Cérebro e Coração (BHI – Himedia) e glicerol, em volumes iguais.

3.2 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO MÍNIMA INIBITÓRIA (CMI) E DA CONCENTRAÇÃO MÍNIMA BACTERICIDA (CMB) DO DICLOFENACO DE SÓDIO

Cinquenta amostras de *S. aureus* (25 de portadores e 25 de origem clínica) foram submetidas a testes para determinar a CMI do diclofenaco pelo método da microdiluição em placa de microtitulação de 96 poços (modelo K12-096, Tissue Culture Plate, KASVI), baseado nas recomendações do Clinical Laboratory Standards Institute – 2013 (CLSI) com adaptações.

Para essa determinação foi preparada uma solução-estoque utilizando o sal da droga dissolvido em uma solução de metanol/água (2:1), esterilizada por filtração em membrana com poros de 0,45 µm.

As amostras bacterianas foram ativadas em Caldo Soja Tripticaseína – TSB (ACUMEDIA) e incubadas a 35°C por 24 horas. A confirmação da pureza foi feita por meio de semeadura por esgotamento em Agar Soja Tripticaseína –TSA (ACUMEDIA) a partir do crescimento bacteriano em Caldo, e as placas semeadas foram incubadas por 24 horas a 35°C. Após o crescimento e confirmação da pureza, cerca de 3 a 5 colônias foram repicadas para 2mL de TSB, e incubadas por 24 horas a 35°C.

A seguir, os crescimentos bacterianos foram diluídos (1:100) em tubos de ensaio contendo TSB, e TSB acrescido de diclofenaco de sódio nas concentrações de 0,75, 1,5, 3,0, 6,0, 12, 25, 50, 100, 200, 400 e 800 µg/mL da droga, preparados a partir da solução-estoque. Após homogeneização das culturas, foram transferidos 200 µL do conteúdo dos tubos, em triplicata, para poços de placa de microtitulação de 96 poços (modelo K12-096, Tissue Culture Plate, KASVI). Foram reservados 3 poços para cada amostra do inóculo diluído em TSB sem adição da droga (controle positivo de crescimento), e 3 poços com TSB sem inóculo (branco). As placas foram mantidas em incubação por 24 horas a 35°C, e após esse período foi feita a leitura visual da CMI e a determinação da densidade óptica do crescimento bacteriano (DO_g) em leitor de ELISA (modelo TP - Reader, Thermo Plate Devices) no comprimento de onda de 620 nm. A partir dos poços identificados como sem crescimento, comparativamente ao controle sem droga, foram realizadas semeaduras de 10 µL, na forma de *spots*, em meio de TSA. Após incubação por 24h a 35°C foi realizada a leitura da CMB, com base na ausência de crescimento bacteriano. Foi realizado um mínimo de três testes independentes para cada amostra bacteriana.

3.3 TRIAGEM PARA IDENTIFICAÇÃO DAS AMOSTRAS DE *S. aureus* NATURALMENTE PRODUTORAS DE BIOFILME EM TSB

Inicialmente as amostras bacterianas foram submetidas a testes para classificá-las quanto a produção e quantificação de biofilme em TSB, utilizando o método de inoculação em placa de microtitulação seguindo as recomendações de Stepanović et al., (2007), com algumas modificações. Após ativação e confirmação da pureza as amostras foram diluídas (1:100) em TSB e TSB com diclofenaco em diferentes

concentrações. Após homogeneização das suspensões em equipamento tipo Vortex, foram transferidas triplicatas de 200 µL do conteúdo dos tubos para os poços de placa de microtitulação de 96 poços. Três poços foram reservados para a realização do controle negativo (branco) e três poços para cada amostra, contendo apenas o inóculo em TSB sem diclofenaco. As placas de microtitulação foram incubadas por 24 horas a 35°C, e posteriormente foi feita a leitura da densidade óptica do crescimento bacteriano ($DO_{620\text{ nm}}$) em leitor de ELISA.

Após a determinação da DO_g , o conteúdo da placa de microtitulação foi descartado em solução de hipoclorito à 200 ppm e os poços foram lavados com 200 µL de água destilada, para remoção do material não aderido.

Após a secagem dos poços à temperatura ambiente, foram adicionados 200 µL de metanol em cada poço (20 minutos) para fixação do biofilme presente. O metanol foi removido por meio de inversão da placa, e esta foi mantida em temperatura ambiente até a secagem dos poços. Foram então adicionados 200 µL de solução de Cristal Violeta de Hucker a 2% (PROQUÍMIOS) em cada poço (15 minutos de contato). A seguir o corante foi removido por inversão da placa e os poços foram lavados por três vezes em cada lado da placa com água destilada corrente, de modo que todos os poços fossem lavados igualmente. Após a lavagem dos poços, a placa foi mantida por um tempo em temperatura ambiente para secagem dos poços, e em seguida foram adicionados 200 µL de álcool etílico aos poços para a extração do biofilme (20 minutos com agitação em agitador orbital - Fanem, modelo 255-B). Procedeu-se então à determinação da densidade óptica do extrato alcoólico do biofilme (DO_{eb}) a 570nm, em leitor de ELISA. Foi realizado um mínimo de três testes independentes para cada amostra.

As amostras bacterianas foram classificadas em produtoras e não produtoras de biofilme, utilizando-se o valor de um ponto de corte, o qual foi determinado previamente por Viana (2016) a partir dos resultados da leitura da DO_{eb} . Foram utilizados os valores de DO_{eb} de triplicatas dos controles negativos, acrescido de 3 vezes o desvio padrão dos resultados. Foram consideradas produtoras de biofilme em TSB as amostras que obtiveram valores de DO_{eb} acima de 0,300, enquanto as amostras com valores inferiores a 0,300 foram consideradas como não produtoras.

As amostras produtoras foram ainda classificadas como produtoras fracas, moderadas ou fortes. Os valores de DO_{eb} e a classificação das amostras quanto ao

nível de produção de biofilme estão expressos na tabela 1, adaptada de Fernandes (2014).

Tabela 1 - Classificação das Amostras Quanto aos Valores de DOeb.

Classificação da amostra	Valores de DOeb
Amostra Não-Produtora	DOeb < 0,300
Amostra Produtora Fraca	0,300 ≤ DOeb < 0,600
Amostra Produtora Moderada	0,600 ≤ DOeb < 1,200
Amostra Produtora Forte	1,200 ≤ DOeb

Fonte: Adaptado de Fernandes (2014)

3.4 EFEITO DO DICLOFENACO NA INDUÇÃO DA PRODUÇÃO DE BIOFILME EM AMOSTRAS DE *S. aureus*

Com base na prévia determinação da CMI descrita no item 3.2, as amostras bacterianas foram testadas frente a diferentes concentrações do diclofenaco para avaliar a capacidade de indução dessa droga na produção de biofilme, ou na intensificação de sua produção nas amostras previamente classificadas como positivas. Foram testadas 40 amostras de *Staphylococcus* (20 clínicas e 20 de portadores).

Os procedimentos seguiram a mesma metodologia descrita no item anterior, sendo que, as triplicatas dos poços com as culturas em TSB sem diclofenaco representaram os controles dos testes, em relação às triplicatas dos poços com as culturas obtidas em TSB com as diferentes concentrações subinibitórias da droga. Foi realizado um mínimo de três testes independentes para cada amostra.

3.5 CLASSIFICAÇÃO DO BIOFILME INDUZIDO PELO DICLOFENACO COMO POLISSACARÍDO OU NÃO-POLISSACARÍDICO

Após a identificação de quais amostras de *S. aureus* apresentaram indução de produção de biofilme na presença de diclofenaco, procedeu-se a determinação da composição química do biofilme induzido, visando classificá-lo como de natureza polissacarídica ou não polissacarídica. Para esta determinação foi utilizado o agente

desagregante de biofilme polissacarídico metaperiodato de sódio (Vetec), preparado em solução 50mM em água destilada, conforme descrito por Frank e Patel (2007). A metodologia seguiu as recomendações descritas por Izano et al., (2008). Foram testadas sete amostras clínicas de *S. aureus* e sete amostras de portadores.

As culturas bacterianas foram crescidas por período de 24h e inoculadas na proporção de 1:100 em TSB acrescido de diclofenaco nas concentrações de 100 e 200 µg/mL. Em seguida, para cada amostra bacteriana e cada concentração da droga, 200 µL das suspensões foram transferidos para oito poços da placa de microtitulação. Quatro poços foram inoculados com a cultura em TSB sem droga (controle).

Após incubação a 35°C por 24 horas, foi realizada a leitura das placas em leitor de ELISA para a determinação da densidade óptica do crescimento bacteriano (DO_{620nm}).

O conteúdo da placa de microtitulação foi então descartado e os poços foram lavados três vezes com 200 µL de água destilada. A seguir, para cada replicata de quatro poços oriundos do crescimento bacteriano na presença de diclofenaco, foram adicionados 200 µL da solução de metaperiodato de sódio, enquanto às outras respectivas replicatas de quatro poços foram adicionados 200 µL de água destilada (controle).

A placa foi acondicionada na estufa a 35°C por 2 horas, e a seguir o agente desagregante foi removido. Após lavagem dos poços com 200 µL de água destilada, e secagem em temperatura ambiente, foram adicionados 200 µL de metanol aos poços por 20 minutos, seguido de adição de 200 µL de solução de cristal violeta de Hucker a 2% por 15 minutos. Os poços da placa de microtitulação foram então lavados três vezes de cada lado com água destilada corrente, e após secagem, foram adicionados 200 µL de etanol absoluto, com a placa sendo mantida sob agitação por 20 minutos em agitador orbital. Ao fim desse tempo, fez-se a leitura da DO_{570nm} do extrato alcoólico em leitor de Elisa a 570nm.

A composição química do biofilme como polissacarídica ou não-polissacarídica foi determinada através dos níveis de desagregação do biofilme pela comparação dos valores de DO_{570nm} na presença do agente desagregante, em relação aos valores de DO_{570nm} obtidos para os seu solvente controle.

3.6 DETERMINAÇÃO DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA DA MATRIZ DO BIOFILME EM AMOSTRAS DE *S. aureus* CRESCIDAS EM MEIO COM DICLOFENACO ASSOCIADO A OUTRAS SUBSTÂNCIAS COM POTENCIAL CAPACIDADE DE INDUÇÃO DA PRODUÇÃO DE BIOFILME

Previamente, foram investigadas substâncias que pudessem determinar a produção de biofilme em 4 amostras de *S. aureus*, escolhidas aleatoriamente entre aquelas que originalmente se mostraram induzidas pelo diclofenaco a produzirem biofilme. As substâncias testadas foram: glicose, NaCl e concentrações subinibitórias de rifampicina. Para esta última droga, previamente, foi determinada a CMI, de acordo com o procedimento descrito no item 3.2, enquanto a pesquisa da produção de biofilme seguiu o procedimento citado no item 3.3.

Após esta triagem inicial, as amostras foram cultivadas em TSB na presença de glicose (1%), NaCl (3%) ou rifampicina (1/2 e 1/4 da CMI) em combinação com diclofenaco nas concentrações de 50 ou 100 µg/mL. O crescimento das amostras foi realizado em placas de microtitulação de 96 poços, com inoculação das culturas em replicatas de oito poços para cada teste envolvendo a combinação das substâncias com o diclofenaco, bem como para replicatas de quatro poços do controle sem as substâncias testadas. Adicionalmente, essas substâncias (glicose, NaCl e rifampicina, além do próprio diclofenaco,) foram inoculadas, isoladamente, em oito replicatas dos poços.

Após incubação das placas e leitura da DO₆₀₀, as culturas foram removidas das placas e os poços lavados com 200µL de água destilada. A seguir, foram adicionados 200µL do reagente para desagregação de biofilme polissacarídico (solução de metaperiodato de sódio). Para o controle dos testes foi utilizada água destilada sem o agente desagregante.

Após incubação das placas por 2 horas a 35°C, os conteúdos dos poços foram removidos, e os poços lavados com 200µL de água destilada. Em seguida, os biofilmes presentes foram fixados com metanol por 20 minutos, corados com 200 µL de solução de Cristal Violeta de Hucker a 2% por 15 minutos, e lavados com água destilada corrente. A extração do corante que impregnou o biofilme em cada poço foi feita com 200 µL de álcool etílico por 20 minutos, em agitador orbital, seguindo-se a determinação da densidade óptica do extrato alcoólico de biofilme (Doeb) a 570nm, conforme descritos nos itens 3.3, 3.4 e 3.5.

A natureza química da matriz do biofilme como polissacarídica ou não polissacarídica foi determinada, indiretamente, como descrito no item 3.5.

3.7 VISUALIZAÇÃO DO BIOFILME INDUZIDO NA PRESENÇA DE DICLOFENACO DE SÓDIO ATRAVÉS DE MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA

As amostras escolhidas para os testes foram ativadas em Caldo TSB, semeadas em TSA para confirmação da pureza, e repicadas para TSB. Após cultivo de 24h a 35°C, as amostras foram diluídas 1/100 em TSB, seguido de adição de solução de diclofenaco, com concentração final da droga no meio de 50µg/mL. As culturas diluídas em meio com droga e meio controle sem droga foram então transferidas para placas de microtitulação de 24 poços contendo lamínulas Thermanox estéril de 13mm (2mL/poço). Para cada amostra foram utilizados 3 poços para o controle sem droga e 3 poços para a cultura no meio com diclofenaco.

Após incubação por 24h a 35°C as lamínulas foram removidas com pinça estéril, lavadas por 6 vezes em PBS corrente com auxílio de pipeta, e transferidas para placas de microtitulação de 24 poços estéreis. A seguir foi realizada a fixação do material por meio da adição em cada poço de 2mL de solução de glutaraldeído 2% em tampão cacodilato 0,1M (pH 7,4). A placa de microtitulação com as lamínulas foram acondicionadas em caixa de isopor com gelo e encaminhadas ao laboratório de microscopia eletrônica do Instituto de Pesquisa de Jardim Botânico, Rio de Janeiro. O processamento das lamínulas consistiu em desidratação com concentrações crescentes de etanol (30%, 50%, 70%, 85% e 95%) por 30 min cada, e etanol absoluto (1h). Após secagem das lamínulas, estas foram submetidas à metalização com ouro e obtidas as imagens em equipamento de microscopia eletrônica de varredura. Os procedimentos foram baseados no protocolo descrito por SHARMA et al. (2008).

4 RESULTADOS

4.1 AVALIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO MÍNIMA INIBITÓRIA DO DICLOFENACO DE SÓDIO PARA AS AMOSTRAS DE *S. aureus*

Cinquenta amostras de *S. aureus* foram avaliadas para determinação das CMI's frente ao diclofenaco de sódio. Foram estudadas 25 amostras isoladas de portadores nasais e 25 de origem clínica. As concentrações pesquisadas variaram de 0,75 a 800 µg/mL da droga.

A CMI registrada para todas as amostras foi de 200 ou 400 µg/mL, conforme mostrado no APÊNDICE 1. No grupo das amostras de portadores observou-se leve predomínio na CMI para a concentração de 400 µg/mL, enquanto para as clínicas o predomínio foi para a concentração de 200 µg/mL. Todas as sementeiras para TSA dos poços em que não se observou ocorrência de turvação, comparativamente ao controle, revelaram crescimento bacteriano, indicando que a CMB foi maior que 800 µg/mL.

4.2 TRIAGEM DAS AMOSTRAS PRODUTORAS DE BIOFILME EM TSB, AVALIAÇÃO DO EFEITO DE CONCENTRAÇÕES SUBINIBITÓRIAS DO DICLOFENACO NA INDUÇÃO DA PRODUÇÃO DE BIOFILME, E COMPOSIÇÃO DO BIOFILME INDUZIDO

Inicialmente procedeu-se a uma triagem para identificar em uma amostragem de 40 isolados de *S. aureus* (20 clínicas e 20 de portadores), quais os produtores de biofilme em TSB sem diclofenaco. Esta pesquisa foi positiva para 6 amostras bacterianas (4 de portadores e 2 clínicas).

Nas 34 amostras restantes, concentrações subinibitórias do diclofenaco induziram a produção de biofilme em 14 (7 clínicas e 7 de portadores) – Tabelas 2 e 3. A concentração em que se observou indução em todos os isolados desse grupo de 14 amostras foi a SUB-CMI de 50 µg/mL da droga, que foi equivalente a valores que variaram de CMI/4 a CMI/8. No grupo de amostras de portadores o biofilme induzido foi classificado como de nível fraco em seis dos isolados, e moderado em um (DOeb > 0,600 e ≤ 1,200) – Tabela 2. O mesmo resultado foi observado no grupo de grupo de amostras clínicas (Tabela 3).

Tabela 2 - CMI, CMB e tipo de biofilme induzido pelo diclofenaco de sódio em amostras de portadores de *S. aureus*

Amostra	CMI (µg/mL)	CMB (µg/mL)	DOeb _{570nm} - C*	DOeb _{570nm} - Diclof.**	Tipo de biofilme
B03	400	> 800	0,235	0,421	N-P
B05	200	> 800	0,184	0,431	N-P
B06	400	> 800	0,175	0,399	N-P
B11	200	> 800	0,163	0,417	N-P
B21	200	> 800	0,178	0,460	N-P
B39	400	> 800	0,192	0,413	N-P
B66	200	> 800	0,258	0,690	N-P

Fonte: O autor

Nota:

*Valores médios de densidade óptica do extrato alcoólico para as amostras-controle crescidas em meio sem diclofenaco; **Valores médios do extrato alcoólico de biofilme para as amostras crescidas em meio com diclofenaco; N-P: biofilme não-polissacarídico, determinado por meio do grau de resistência à degradação pelo metaperiodato de sódio; CMI: Concentração mínima inibitória; CMB: Concentração mínima bactericida.

Tabela 3 - CMI, CMB e tipo de biofilme induzido pelo diclofenaco de sódio em amostras clínicas de *S. aureus*

Amostra	CMI (µg/mL)	CMB (µg/mL)	DOeb _{570nm} - C*	DOeb _{570nm} -Diclof.**	Tipo de biofilme
SA08	200	> 800	0,201	0,557	N-P
SA10	400	> 800	0,233	0,469	N-P
SA12	400	> 800	0,195	0,513	N-P
SA13	200	> 800	0,201	0,482	N-P
SA20	200	> 800	0,224	0,482	N-P
SA39	400	> 800	0,189	0,698	N-P
SA50	400	> 800	0,214	0,477	N-P

Fonte: O autor

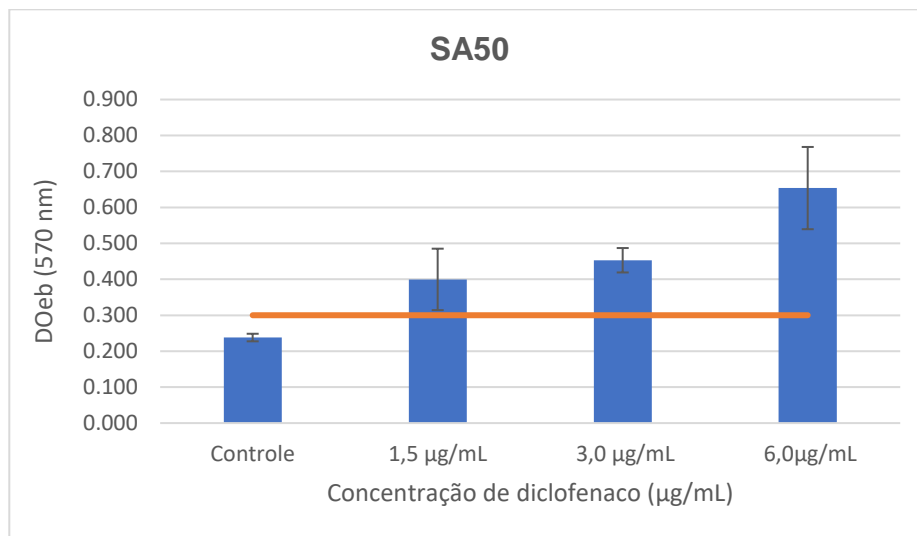
Nota:

*Valores médios de densidade óptica do extrato alcoólico para as amostras-controle crescidas em meio sem diclofenaco; **Valores médios do extrato alcoólico de biofilme para as amostras crescidas em meio com diclofenaco; N-P: biofilme não-polissacarídico, determinado por meio do grau de resistência à degradação pelo metaperiodato de sódio; CMI: Concentração mínima inibitória; CMB: Concentração mínima bactericida.

Ainda nesse grupo de 14 amostras, em quase todos os isolados a concentração de 100 $\mu\text{g/mL}$ também se mostrou indutora de biofilme, representando valores que variaram de CMI/2 a CMI/4. Em termos de quantidade de biofilme induzido pela droga, representada pelos valores de DOeb, os resultados foram similares para as concentrações de 50 e 100 $\mu\text{g/mL}$, o mesmo se observando para as demais SUB-CMIs em que a indução foi detectada (resultados não mostrados).

Na amostra SA50, além das concentrações de 50 e 100 $\mu\text{g/mL}$, o diclofenaco induziu produção de biofilme em praticamente todas as concentrações abaixo destas. Nesse isolado, 1,5 $\mu\text{g/mL}$ da droga determinou aumento médio da DOeb de 68,2% em relação ao controle sem droga, enquanto para 3,0 $\mu\text{g/mL}$ o aumento foi de 90,4%. Na concentração de 0,75 $\mu\text{g/mL}$ não foi observado efeito indutor do AINE na produção de biofilme. A figura 5 apresenta os resultados de indução de biofilme para essa amostra nas concentrações de 1,5, 3,0 e 6 $\mu\text{g/mL}$.

Figura 5 - Produção de biofilme da amostra SA50 na presença de baixas concentrações de diclofenaco



Com base nas medidas de $\text{DOg}_{(620\text{nm})}$, na concentração de 50 $\mu\text{g/mL}$ de diclofenaco foi observada uma redução do crescimento bacteriano que variou de 30,9 a 58,1% para as amostras clínicas, e de 23,8 a 51,7% para as de portadores (Tabela 4 e 5). Os percentuais de redução do crescimento bacteriano para a concentração de 100 $\mu\text{g/mL}$ foram similares aos observados para a concentração de 50 $\mu\text{g/mL}$ (dados não mostrados).

Tabela 4 - Taxas de redução dos valores de densidade óptica do crescimento (DOg) de amostras de *S. aureus* de portadores em TSB com diclofenaco em relação ao controle sem a droga

Amostra	Teste 1 (Cont./Diclof.)	Teste 2 (Cont./Diclof.)	Teste 3 (Cont./Diclof.)	Média	% de Redução da DOg*
B03	0,822 / 0,474	0,815 / 0,337	0,886 / 0,408	0,841 / 0,400	51,7
B05	0,845 / 0,445	0,764 / 0,311	0,734 / 0,480	0,781 / 0,410	47,2
B06	0,716 / 0,419	0,758 / 0,461	0,875 / 0,424	0,783 / 0,425	44,4
B11	0,760 / 0,342	0,663 / 0,337	0,690 / 0,379	0,704 / 0,350	49,8
B21	0,725 / 0,508	0,676 / 0,586	0,778 / 0,565	0,726 / 0,550	23,8
B39	0,636 / 0,439	0,780 / 0,412	0,666 / 0,470	0,694 / 0,440	36,5
B66	0,898 / 0,489	0,853 / 0,579	0,672 / 0,480	0,808 / 0,510	35,9

Nota:

(): valores médios de DOg de triplicatas das amostras crescidas em TSB sem diclofenaco - Cont. - e das amostras crescidas em TSB com 50 µg/mL de diclofenaco; *: média geral percentual de redução do valor da DOg das amostras crescidas em TSB com diclofenaco, em relação ao controle sem a droga.

Tabela 5 - Taxas de redução dos valores de densidade óptica de crescimento (DOg) de amostras clínicas de *S. aureus* em TSB com diclofenaco em relação ao controle sem a droga

Amostra	Teste 1 (Cont./Diclof.)	Teste 2 (Cont./Diclof.)	Teste 3 (Cont./Diclof.)	Média	% de Redução da DOg*
SA08	0,759 / 0,375	0,816 / 0,371	0,793 / 0,411	0,789 / 0,386	51,0
SA10	0,953 / 0,380	0,872 / 0,367	0,812 / 0,385	0,879 / 0,377	57,1
SA12	0,768 / 0,338	0,862 / 0,325	0,756 / 0,337	0,795 / 0,333	58,1
SA13	0,798 / 0,550	0,676 / 0,508	0,839 / 0,537	0,771 / 0,532	30,9
SA20	0,818 / 0,471	0,822 / 0,421	0,830 / 0,390	0,823 / 0,427	48,1
SA39	0,811 / 0,428	0,796 / 0,458	0,777 / 0,442	0,795 / 0,443	44,2
SA50	0,717 / 0,417	0,757 / 0,383	0,827 / 0,400	0,767 / 0,400	47,8

Nota:

(): valores médios de DOg de triplicatas das amostras crescidas em TSB sem diclofenaco - Cont. - e das amostras crescidas em TSB com 50 µg/mL de diclofenaco; *: média percentual geral de redução do valor da DOg das amostras crescidas em TSB com diclofenaco, em relação ao controle sem a droga.

No grupo de seis amostras caracterizadas como sendo naturalmente produtoras de biofilme em TSB sem diclofenaco, em uma (SA16) o diclofenaco determinou aumento na quantidade do biofilme produzido, inclusive na concentração de 3 µg/mL. O aumento médio encontrado nessa concentração foi de 32,2%.

Tanto nas amostras de *S. aureus* de portadores quanto nas clínicas, todos os biofilmes induzidos por SUB-CMIs da droga foram de natureza não-polissacarídica (Tabelas 3 e 4). Porém, na amostra naturalmente produtora de biofilme em TSB - SA16 – e que mostrou aumento na quantidade de biofilme na presença de diclofenaco, a composição do biofilme mostrou-se polissacarídica, tanto na presença quanto na ausência da droga.

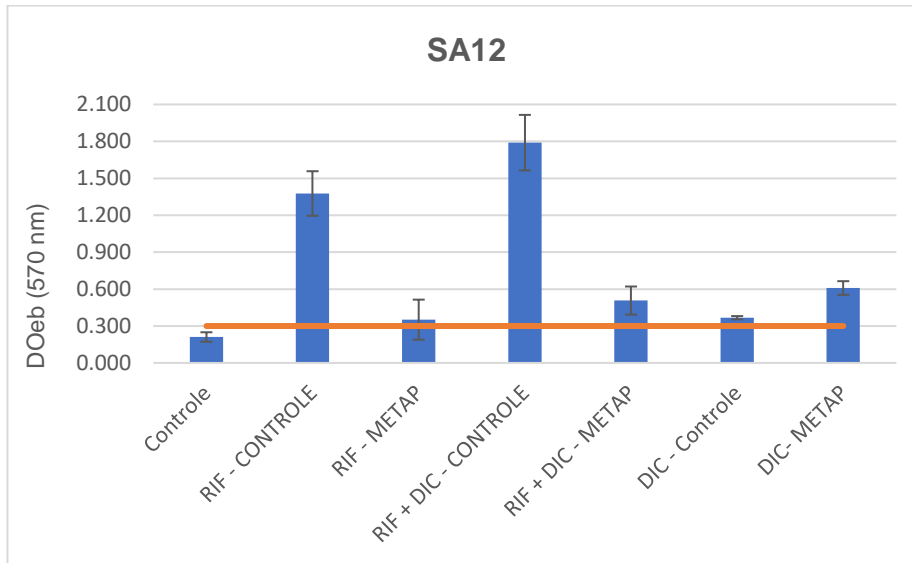
4.3 AVALIAÇÃO DO NÍVEL E COMPOSIÇÃO DO BIOFILME INDUZIDO PELO DICLOFENACO, QUANDO ASSOCIADO A GLICOSE, NA CL E CONCENTRAÇÕES SUBINIBITÓRIAS DE RIFAMPICINA

Entre as amostras biofilme-induzidas pelo diclofenaco, quatro (B03, SA12, SA39 e SA50) foram escolhidas aleatoriamente para avaliar seu comportamento na presença de algumas substâncias tidas como potenciais indutoras de biofilme. Com base na determinação das CMIs, as concentrações de rifampicina empregadas nos testes foram de 0,004 µg/mL – correspondente a metade da CMI (CMI/2], e 0,002 µg/mL, correspondente a CMI/4.

SUB-CMIs de rifampicina não induziram produção de biofilme no isolado SA39, enquanto nos outros três isolados (B03, SA12 e SA50) foi observada forte produção, sendo que o biofilme induzido nestas condições foi caracterizado como sendo de natureza polissacarídica.

No isolado SA12 a combinação de rifampicina (CMI/2) + diclofenaco determinou aumento nos níveis de produção de biofilme de 30,4%, em média, em relação à rifampicina somente. A composição polissacarídica do biofilme induzido pela rifampicina foi mantida na presença de rifampicina + diclofenaco, enquanto o biofilme do isolado controle, que foi induzido somente pelo diclofenaco, manteve sua composição original não-polissacarídica (Figura 6).

Figura 6 - Composição do biofilme produzido pela amostra SA12 na presença de concentrações subinibitórias de diclofenaco e rifampicina



Resultados similares foram encontrados para os isolados B03 e SA50 na combinação de rifampicina + diclofenaco: aumento médio de, respectivamente, 32,3% e 45,7% nos níveis de produção de biofilme, e manutenção da natureza polissacarídica do biofilme induzido pela combinação das duas drogas (Figuras 7 e 8).

Figura 7 - Composição do biofilme produzido pela amostra B03 na presença de concentrações subinibitórias de diclofenaco e rifampicina

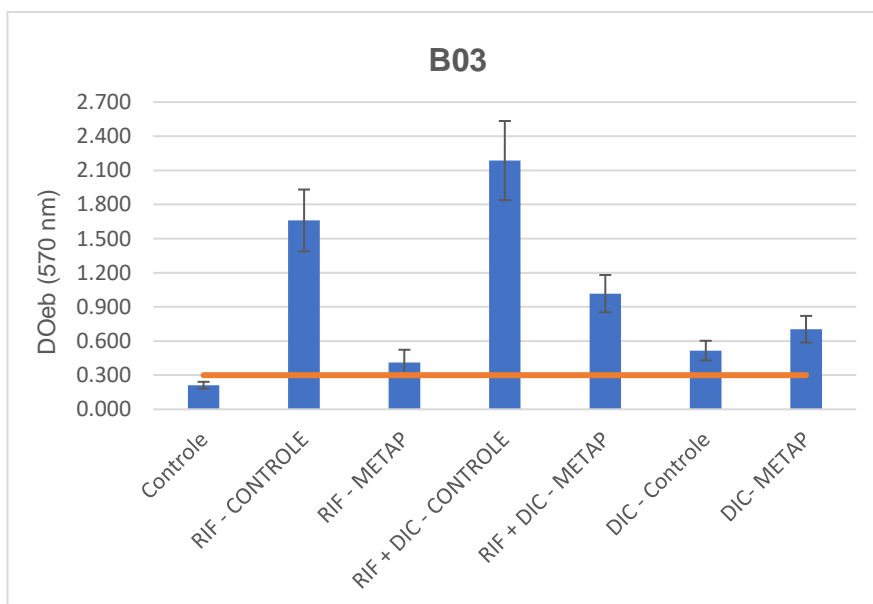
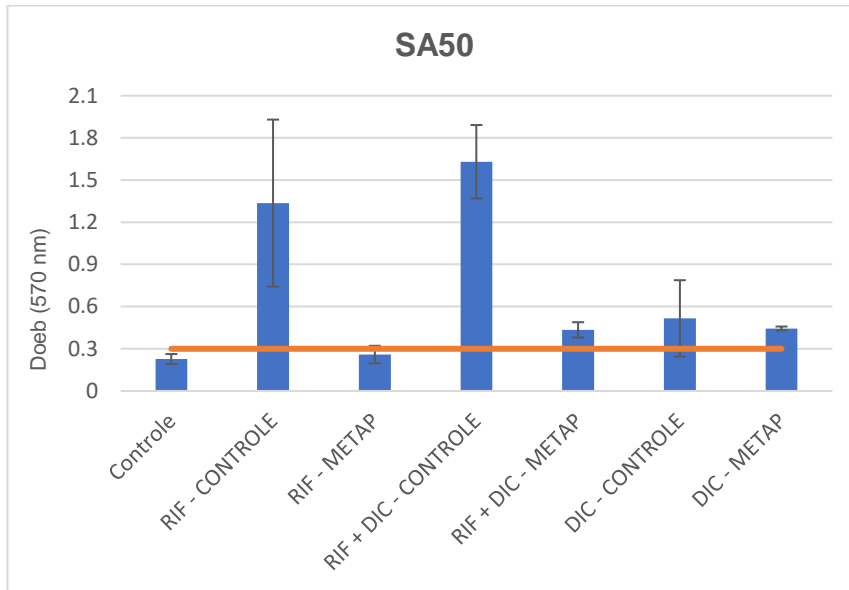


Figura 8 - Composição do biofilme produzido pela amostra SA50 na presença de concentrações subinibitórias de diclofenaco e rifampicina



O nível de produção de biofilme induzido pela rifampicina e pela combinação rifampicina + diclofenaco foi classificado como forte (de acordo com os critérios estabelecidos por Fredheim et al., (2009), enquanto o biofilme induzido somente pelo diclofenaco foi classificado como fraco.

Os resultados obtidos para a combinação de diclofenaco com rifampicina em concentração de 0,002 µg/mL (CMI/4) foram similares aos de 0,004 µg/mL (CMI/2), exceto para a amostra B03, na qual a natureza do biofilme induzido variou de não polissacarídica a parcialmente polissacarídica (resultados não mostrados).

Tal como foi observado para os testes com SUB-CMIs de rifampicina, NaCl não induziu biofilme em um dos quatro isolados (SA12). Porém, para essa amostra, o crescimento em meio com o sal combinado com diclofenaco resultou em inibição do biofilme que normalmente era induzido pelo AINE isoladamente.

Em duas amostras (B03 e SA50) o NaCl induziu biofilme polissacarídico, mas na presença de NaCl + diclofenaco o biofilme induzido revelou uma composição mais próxima dos controles produtores de biofilme não-polissacarídico induzido pelo diclofenaco. (Figuras 9 e 10). Ao contrário do que foi observado para as amostras B03 e SA50, na presença de NaCl o isolado SA39 produziu biofilme não-polissacarídico, bem como, na presença de NaCl + diclofenaco (Figura 11).

Figura 9 – Composição do biofilme produzido pela amostra B03 na presença de 50 µg/mL de diclofenaco e NaCl (3%)

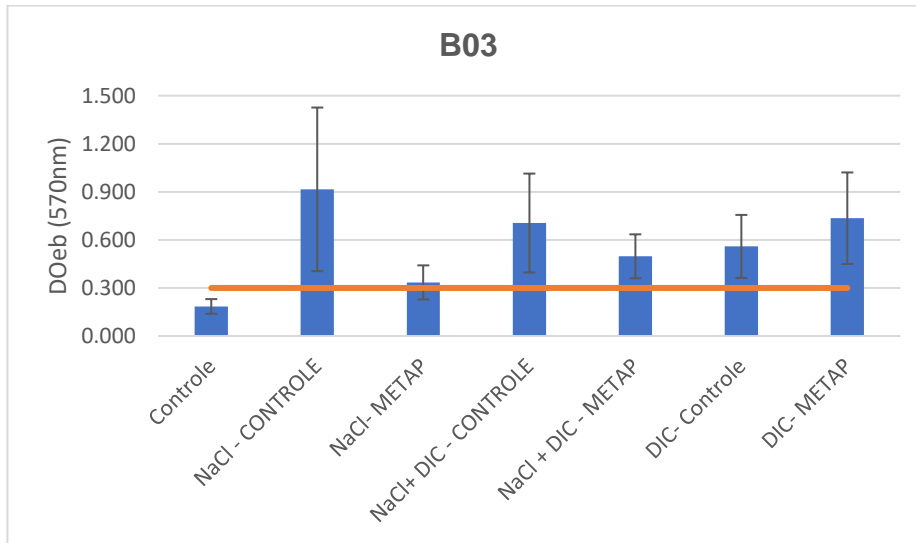


Figura 10 - Composição do biofilme produzido pela amostra SA50 na presença de 50 µg/mL de diclofenaco e NaCl (3%)

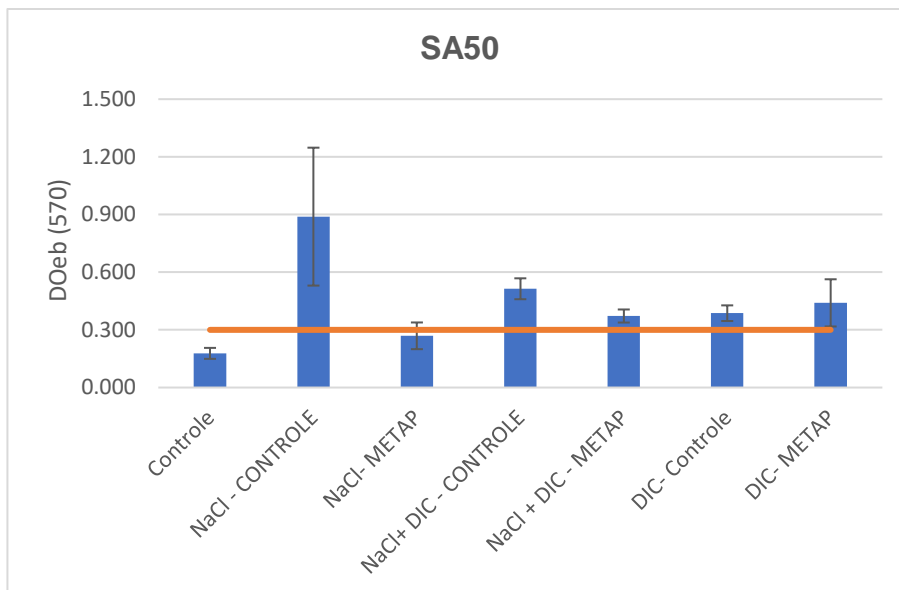
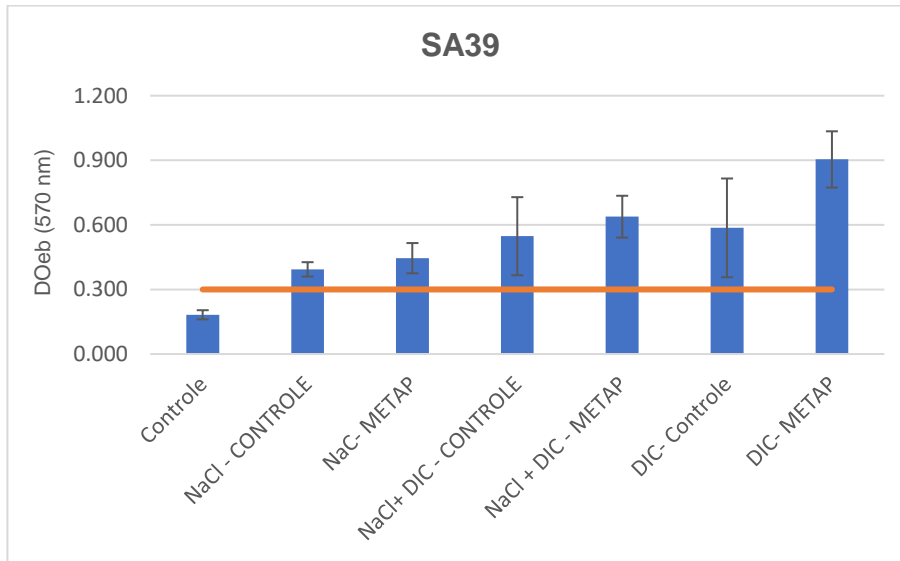


Figura 11 - Composição do biofilme produzido pela amostra SA39 na presença de 50 µg/mL de diclofenaco e NaCl (3%)



Quanto ao efeito da glicose (1g), todos os quatro isolados estudados mostraram indução para produção de biofilme não-polissacarídico resultado que foi mantido quando a amostra foi cultivada em meio com glicose + diclofenaco. Como constatado para o NaCl, a combinação de glicose com diclofenaco não resultou em efeito sinérgico na produção de biofilme (Figuras 12,13, 14 e 15).

Figura 12 - Composição do biofilme produzido pela amostra SA12 na presença de 50 µg/mL de diclofenaco e glicose (1%)

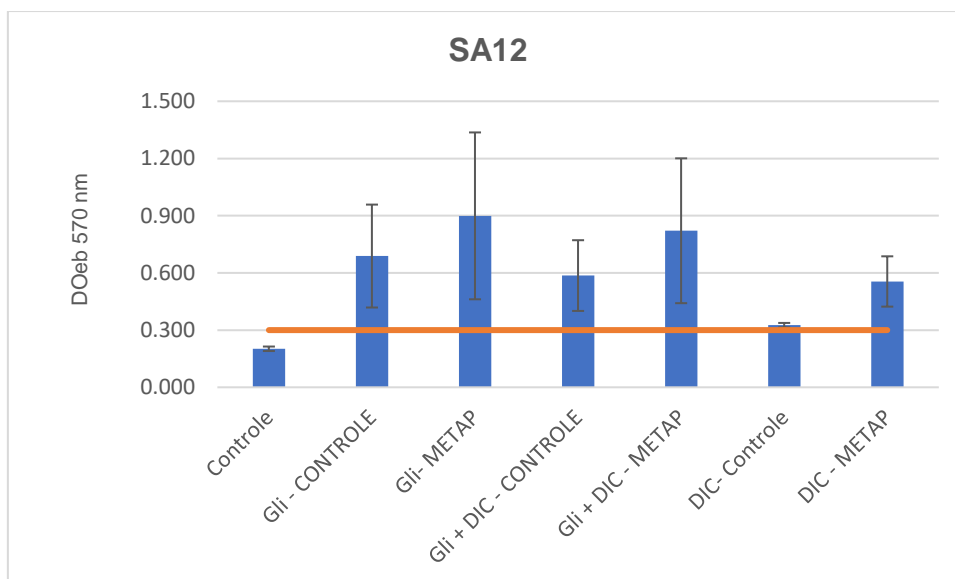


Figura 13 - Composição do biofilme produzido pela amostra B03 na presença de 50 µg/mL de diclofenaco e glicose (1%)

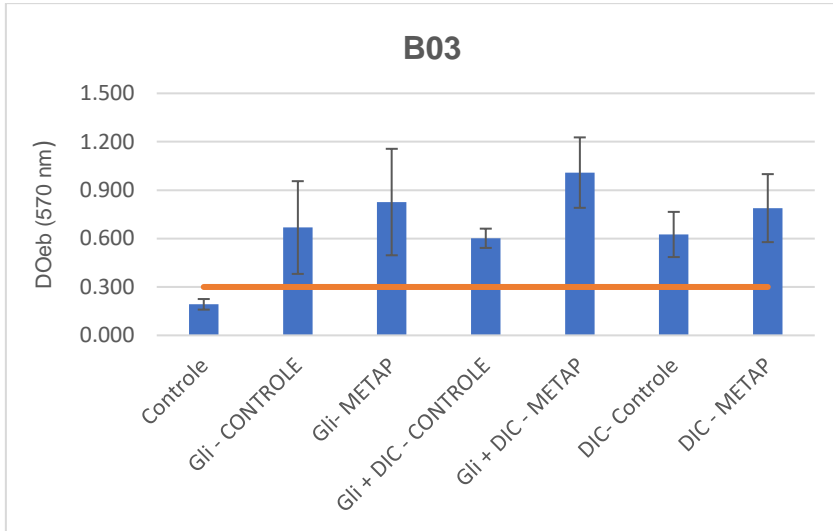


Figura 14 - Composição do biofilme produzido pela amostra SA50 na presença de 50 µg/mL de diclofenaco e glicose (1%)

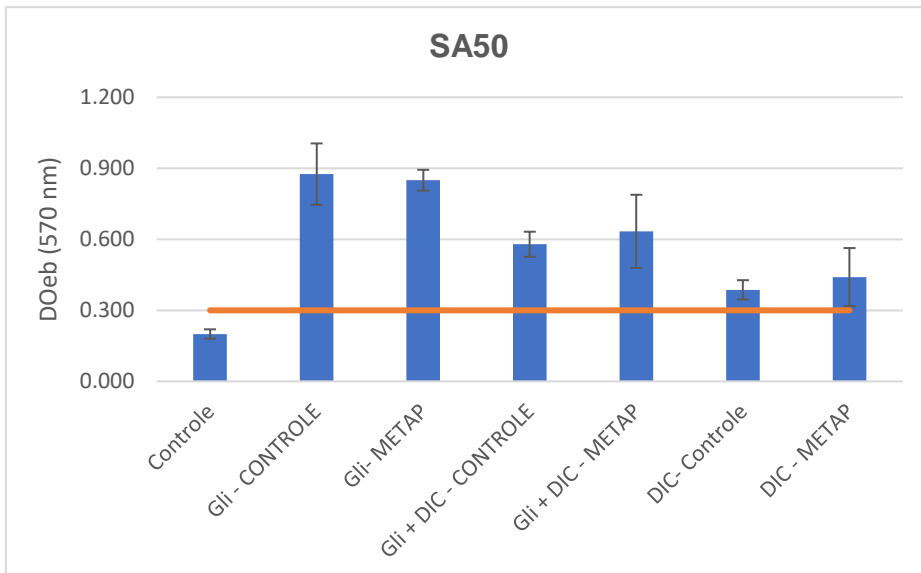
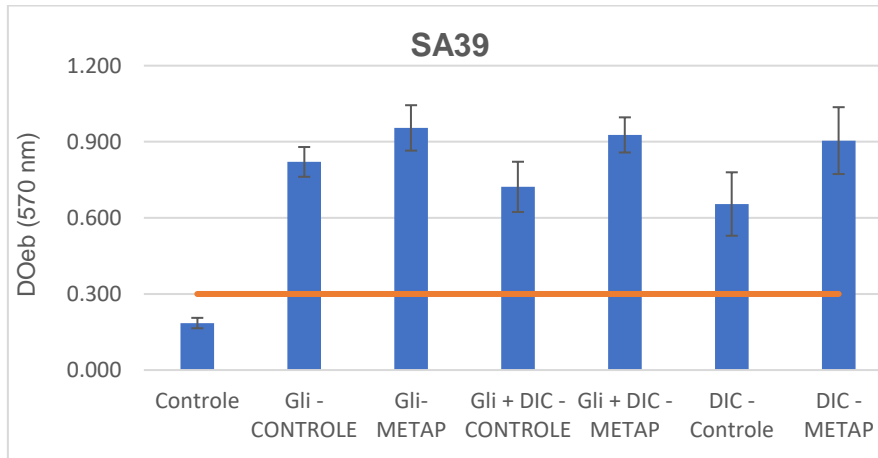


Figura 15 - Composição do biofilme produzido pela amostra B03 na presença de 50 µg/mL de diclofenaco e glicose (1%)

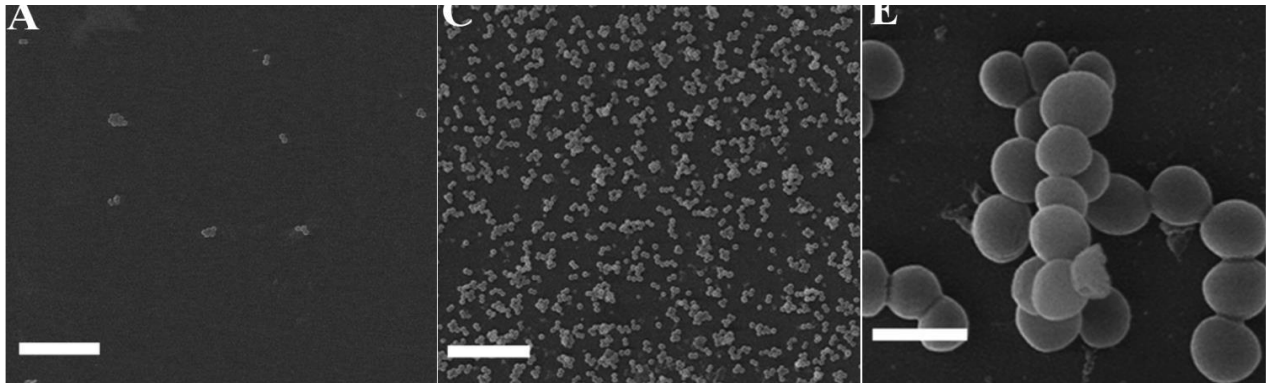


4.4 ANÁLISE DA ESTRUTURA DO BIOFILME INDUZIDO PELO DICLOFENACO EM DUAS AMOSTRAS DE *S. aureus*, MEDIANTE ESTUDO DE MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA

As amostras B03 e SA50 foram escolhidas para avaliação estrutural do biofilme induzido pelo diclofenaco por meio de Microscopia Eletrônica de Varredura (Figuras 16 e 17).

No controle das amostras crescidas na superfície de membranas plásticas Thermanox em meio de TSB sem diclofenaco, as imagens revelaram pouquíssimas células aderidas. Ao contrário, após o cultivo em meio com 50 µg/mL do AINE, foram evidenciadas grandes quantidades de agregados de células. As imagens magnificadas das culturas mostraram presença de pouco material constituinte da matriz extracelular, principalmente na amostra B03. Não foram observadas alterações significativas na morfologia das células bacterianas crescidas no meio com o anti-inflamatório.

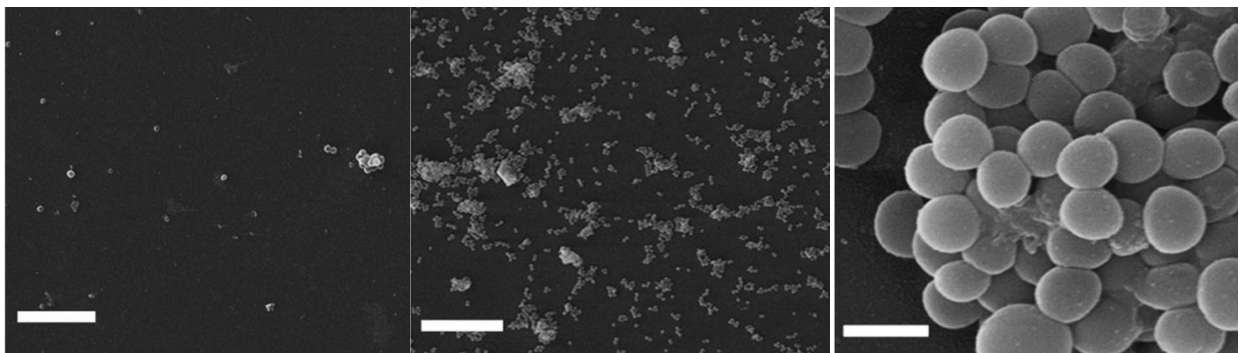
Figura 16 - Microscopia Eletrônica de Varredura da amostra B03 crescida em TSB sem e com diclofenaco.



Nota:

A: controle (crescimento em TSB sem diclofenaco – barra de escala: 10 µm); B e C: crescimento em TSB com 50 µg/mL de diclofenaco - barras de escala: 10 µm e 1 µm, respectivamente.

Figura 17 - Microscopia Eletrônica de Varredura da amostra SA39 crescida em TSB sem e com diclofenaco.



Nota:

A: controle (crescimento em TSB sem diclofenaco – barra de escala: 10 µm); B e C: crescimento em TSB com 50 µg/mL de diclofenaco - barras de escala: 10 µm e 1 µm, respectivamente.

5 DISCUSSÃO

A multirresistência bacteriana é um fenômeno que vem aumentando com velocidade crescente em todo o mundo. Novos mecanismos de resistência têm sido descritos em diferentes patógenos bacterianos, representando uma ameaça ao tratamento efetivo de doenças infecciosas comuns com os antimicrobianos atualmente disponíveis. O problema é agravado nas infecções bacterianas associadas a biofilme, que quando presente atua como uma barreira que impede o acesso de antimicrobianos e evita a ação de fagócitos ao micro-organismo.

As dificuldades da indústria farmacêutica em dar respostas resolutivas rápidas ao fenômeno da resistência bacteriana a antimicrobianos tornou urgente o estabelecimento de abordagens alternativas para o controle de tais infecções. Entre essas abordagens inclui-se a possibilidade da utilização de drogas conhecidas como “não-antibióticos”, seja para uso único ou como adjuvante aos antimicrobianos convencionais. Por definição, este grupo de drogas inclui fármacos que, embora apresentem uma ação antibacteriana de amplo espectro, não é essa a sua finalidade primária de uso clínico (Kristiansen, 1992).

Fazem parte da classe dos “não-antibióticos” os AINE, e neste subgrupo encontra-se o diclofenaco, uma droga que demonstra atividade antimicrobiana de amplo espectro, tanto *in-vitro* quanto *in-vivo*. Além disso, esse AINE tem sido descrito como dotado de uma atividade anti-biofilme (LIMA-E-SILVA; SILVA, 2018). No presente estudo foi avaliada a atividade antimicrobiana do diclofenaco de sódio sobre amostras clínicas e de portadores de *S. aureus*, bem como seu efeito em concentrações subinibitórias (SUB-CMIs) sobre a formação de biofilme, isoladamente e quando combinado a substâncias como glicose, NaCl e rifampicina em concentrações não-inibitórias.

A CMI do diclofenaco obtida para um grupo de 50 amostras de *S. aureus* (25 isoladas de portadores e 25 clínicas) ficou entre 200 e 400 µg/mL, não se notando diferenças muito discrepantes em relação à origem dos isolados. Na literatura, constatamos que as CMIs dessa droga para *S. aureus* apresentam grandes variações. Tais variações podem ser decorrentes de características intrínsecas dos isolados estudados, mas também de procedimentos metodológicos como o modo de solubilização da droga (por exemplo, água destilada em vez de metanol ou DMSO), meio de cultura e a técnica empregada.

Em estudo com uma amostra de referência de *S. aureus* (NCTC 6571), Dastidar et al., (2000) e Dutta et al., (2007) com emprego, respectivamente, das técnicas de diluição em Caldo e diluição em ágar, encontraram CMI com valor inferior aos constatados em nossos resultados (50 µg/mL). Valores de CMI similares aos de nosso estudo foram evidenciados por Alqahtani et al., (2018) com *S. aureus* ATCC 25923 (250 µg/mL) e Chan et al., (2017) com *S. aureus* ATCC 33591 (312 µg/mL), ambos com emprego da técnica de diluição em Caldo.

Resultados mais altos de CMIs foram descritos por AL-Janabi et al., (2009) para amostras clínicas de *S. aureus* (615 µg/mL - diluição em Caldo), Chan et al., (2017) para *S. aureus* ATCC 25923 (1250 µg/mL - diluição em Caldo) e Molsen et al., (2015) para ATCC 6538 (1465 µg/mL – difusão pelo método de adição da droga em poço de agar).

Dutta et al., (2007) encontraram CMI entre 50 e > 1000 µg/mL (diluição em agar), enquanto Chan et al., (2017) relataram variações na CMI de 312 a 2500 µg/mL – diluição em Caldo). Já Ahmed et al., (2017) mostraram que a CMI variou de uma concentração tão baixa como 8 µg/mL, a até 1024 µg/mL – diluição em agar), ressaltando-se porém, que a CMI₉₀ foi de 256 µg/mL.

Considerando-se os resultados obtidos para outras espécies de *Staphylococcus*, Perilli et al., (2000) encontraram CMI de 250 µg/mL do diclofenaco para amostras clínicas de *S. epidermidis*, enquanto Ahmed et al., (2017) relataram para isolados clínicos de Estafilococos Coagulase Negativos valores que variaram de 0,5 a 1024 µg/mL, com CMI₉₀ de 256 µg/mL (diluição em agar).

Outros gêneros e espécies bacterianas também mostram expressivas variações na CMI do diclofenaco. Por exemplo, para amostras clínicas de *Bacillus* spp. e *B. subtilis* os valores foram, respectivamente de 0,5 a 2 e 0,35 µg/mL, enquanto para *B. subtilis* ATCC 23857 foi de 50 µg/mL. Amostras de referência de *Listeria monocytogenes* também apresentaram CMI de 50 µg/mL, enquanto para amostras clínicas e de referência de *Mycobacterium* a CMI variou de 10 a 2510 µg/mL. Para bactérias Gram negativas como *E. coli* (amostras clínicas e de referência) são apontados valores como 2, 10, 50, 1024, 2500, 0,25-1024 e 2500 µg/mL, enquanto para *Salmonella* estes variam de 50 a 2500 µg/mL. CMI de apenas 2 µg/mL foi relatada para amostra clínica de *Proteus mirabilis*, ao passo que para *Proteus* spp. ficou entre 2 e 64 µg/mL (LIMA e SILVA; SILVA, 2018).

Com base nessa ampla faixa de CMI da droga descrita na literatura, conclui-se que, no caso de uma eventual perspectiva de vir a se utilizar AINE como o diclofenaco em uma terapêutica com fins de ação antimicrobiana, a situação deve ser avaliada caso a caso, de acordo com a amostra bacteriana envolvida. Como apontado acima, algumas CMIs (por exemplo, 2 µg/mL) estão dentro da faixa da concentração plasmática que pode ser naturalmente atingida com o uso da droga (WILLIS et al., 1979), enquanto outras estão muito além das concentrações séricas normais. As CMIs obtidas em nosso estudo se enquadram nesta última situação. Devem ser consideradas, entretanto, algumas condições em que concentrações mais altas de medicamentos podem ser alcançadas. No caso do diclofenaco, por exemplo, a droga penetra eficientemente no líquido sinovial inflamado, onde altas concentrações são mantidas em comparação com as concentrações plasmáticas (TODD; SORKIN, 1988). Concentrações mais elevadas de AINE podem ser alcançadas também na urina ou com terapia tópica. No primeiro caso, por exemplo, dois terços das mulheres com infecções do trato urinário sem complicações (80% com *E. coli*) que são tratadas com o AINE ibuprofeno se recuperam sem o uso de antibióticos (ZIMMERMANN; CURTIS, 2017).

Após a determinação da CMI do diclofenaco para as amostras de *S. aureus*, foi investigada a concentração mínima bactericida, visando estabelecer uma avaliação sobre o efeito bacteriostático ou bactericida da droga. O mecanismo de ação deste AINE parece residir principalmente na inibição da síntese de DNA (DASTIDAR et al., 2000). Em *E. coli*, por exemplo, alguns AINE mostraram habilidade para inibir a subunidade β da DNA polimerase III. A mudança nesta subunidade, como consequência da ligação à molécula do AINE, resultou na inibição da replicação do DNA e dos processos de reparo (YIN et al., 2014). Além disso, o aumento na absorção de brometo de etídio em células de *S. aureus* expostas ao diclofenaco forneceu evidências de que os AINE também podem atuar comprometendo a integridade da membrana celular (REHAB; SHEREIN, 2016).

Em todas as concentrações de diclofenaco testadas que se mostraram inibitórias para as amostras de *S. aureus* (200 a 800 µg/mL), o efeito constatado foi o de uma ação bacteriostática. Esse resultado se contrapõe aos relatados por vários autores, que apontaram um efeito bactericida da droga para bactérias Gram positivas, Gram negativas e Micobactérias. Porém, Perilli et al., (2000), concordantemente com

nossos achados, demonstraram que a ação do diclofenaco para *S. epidermidis* foi bacteriostática, uma vez que subcultivos das amostras em meio sem a droga restauraram suas taxas normais de crescimento.

A pesquisa de produção de biofilme em TSB sem aditivos para 40 amostras de *S. aureus* (20 clínicas e 20 de portadores) mostrou-se positiva para 6 amostras (2 clínicas e 4 de portadores). Estas amostras, bem como as 34 restantes que se mostraram negativas, foram avaliadas quanto ao efeito de SUB-CMIs do diclofenaco na produção de biofilme.

Nas 34 amostras negativas em TSB, o diclofenaco induziu a produção de biofilme em 14 (7 clínicas e 7 de portadores), sendo que a concentração que determinou indução para todos os isolados foi de 50 µg/mL, concentração esta que representou valores que variaram de CMI/4 a CMI/8. Os valores destas SUB-CMIs estão de acordo com aquelas que são observadas na produção de biofilme induzida por SUB-CMIs de alguns antibióticos (KAPLAN, 2011). Esses resultados de indução de biofilme pelo diclofenaco em uma parcela dos isolados estudados se mostram interessantes, uma vez que as descrições na literatura apontam esta droga como tendo um potencial efeito anti-biofilme para diferentes patógenos bacterianos.

Um dos estudos que obteve resultados opostos aos nossos foi o de Hegazy (2016). Investigando amostra de *P. mirabilis* isolada de úlcera de pé diabético, esse autor mostrou que concentrações subinibitórias de diclofenaco resultaram em inibição acentuada da formação de biofilme (90% em ½ da CMI) e diminuíram o valor da concentração inibitória mínima do biofilme para diferentes antibióticos testados. A adesão bacteriana primária não foi significativamente afetada, indicando que a atividade efetiva da droga ocorreu durante os últimos estágios da formação do biofilme. Conforme relatado por esse autor, a ação da droga em um estágio mais tardio da formação de biofilme pode estar relacionada ao seu efeito sobre o sistema de sinalização intercelular *quorum sensing*. Foram relatados, ainda, efeitos desse AINE sobre outros fatores de virulência do patógeno, tais como, inibição da motilidade *swarming* e *swimming*, e significativa diminuição da atividade das enzimas protease, hemolisina e urease do microrganismo. Com base nesses resultados envolvendo uma ação anti-fatores de virulência para *P. mirabilis*, Hegazy apontou que o diclofenaco

pode ser uma droga útil para pacientes diabéticos que necessitam de tratamentos anti-inflamatórios e analgésicos.

El-Baky; El-Gendy, (2016) também relataram que diferentes AINE produziram um efeito inibitório perceptível tanto na formação de biofilme quanto no biofilme pré-formado de *S. aureus*. Enquanto o meloxicam foi identificado como o AINE com a maior capacidade de inibir a formação de biofilme, o diclofenaco foi encontrado para ter a maior capacidade de degradar o biofilme pré-formado. Ambos os efeitos foram superiores aos observados para a quinolona levofloxacina. Este estudo revelou ainda que estes AINE regularam negativamente a expressão do gene *icaA*, um dos componentes do operon *icaADBC*, que codifica a produção de PIA (adesina intercelular polissacarídica), o principal componente da matriz extracelular do biofilme polissacarídico em *Staphylococcus* (CRAMTON et al., 1999).

Perilli (2000) relatou que o efeito antibiofilme do diclofenaco pode variar de acordo com características particulares do micro-organismo. Investigando duas amostras de *S. epidermidis* isoladas de infecção associada a cateter, uma negativa e uma positiva para um antígeno associado a *slime* (SAA), o autor mostrou que tratamentos de curto prazo com diclofenaco reduziram significativamente a produção de biofilme na amostra SAA negativa, enquanto a SAA positiva não foi afetada. Após colonização na superfície de lente de contato com exposição à droga, imagens de microscopia eletrônica de varredura confirmaram que a droga promoveu completa desorganização da estrutura do biofilme na amostra SAA negativa. A ausência de efeito do AINE na amostra SAA positiva foi atribuída ao tipo de material presente na composição de seu de *slime*.

Em uma amostra clínica de *P. aeruginosa* classificada como produtora de biofilme forte, o diclofenaco (1/4 da CIM) reduziu a sua formação para cerca de 60% daquela observada no controle (ABBAS, 2015). No entanto, um estudo anterior desse autor mostrou que a atividade da droga em biofilmes pré-formados por amostras clínicas de *P. aeruginosa* foi apenas moderada (ABBAS et al., 2012).

Em algumas investigações, o objetivo principal foi avaliar se AINE - combinados entre si ou associados a outras substâncias - afetam a formação de biofilme ou alteram a densidade de biofilmes pré-formados. Neste caminho, Baldiris et al., (2016) relataram que a combinação de diclofenaco com ibuprofeno em concentrações subinibitórias produziu uma redução significativa na formação de biofilme em isolados

clínicos de *K. pneumoniae* e *E. coli*, ambos previamente caracterizados como produtores de biofilme forte. Adicionalmente, a associação do diclofenaco (e também do ibuprofeno) com N-acetilcisteína resultou em um marcante efeito disruptivo de biofilmes maduros formados por algumas bactérias Gram-negativas e *S. aureus* (MOHSEN et al., 2015).

Outra combinação que resultou em aumento do efeito anti-biofilme foi a associação do diclofenaco ou ibuprofeno com pasta de hidróxido de cálcio (HC), substância amplamente utilizado em odontologia devido a seus efeitos antimicrobianos e biológicos. A combinação desses AINE com HC não interferiu no pH da pasta, mas aumentou a ação antimicrobiana contra o biofilme de *Enterococcus faecalis* (FREITAS et al., 2017). Os autores sugeriram que o uso de AINE (como o diclofenaco) em conjunto com a pasta de HC seria uma possível alternativa ao uso de antibióticos na odontologia.

Uma investigação muito interessante sobre o impacto do diclofenaco (e do AINE ibuprofeno) sobre a produção de biofilme foi conduzida por Reśliński et al., (2015). Os autores mostraram que essas drogas nas concentrações, respectivamente, de 1 e 20 µg/mL limitaram a formação de biofilme forte produzido por amostras clínicas de *S. aureus* e *E. coli* na superfície de uma tela de prolipropileno, que comumente é utilizada em cirurgia de hérnia.

Foi apontado por esses autores, entretanto, que o percentual de amostras de *S. aureus* produtoras de biofilme fraco no controle (1,4%) aumentou de modo estatisticamente significativo para 10% após a exposição ao diclofenaco. Em *E. coli* o aumento no percentual de produtoras de biofilme fraco foi de 10% para 31,4 %. Resultado similar foi obtido para o ibuprofeno. É importante destacar que estes resultados foram obtidos utilizando-se concentrações das drogas que são alcançadas no soro humano. Este é o único registro encontrado na literatura, referente a um aumento na quantidade da produção de biofilme induzido por estes AINE. Portanto, esse é um resultado que se aproxima de alguns de nossos achados. No que se refere à concentração de diclofenaco que é capaz de afetar a produção de biofilme, é importante destacar o comportamento da amostra SA50 que, além das concentrações mais elevadas da droga (50 e 100 µg/mL), mostrou-se induzida em concentrações tão baixas quanto 1,5 e 3 µg/mL. Destaca-se também o comportamento da amostra SA16, uma produtora natural de biofilme em TSB que mostrou aumento da quantidade de

biofilme produzido na presença de diclofenaco em até em concentração de até 6 µg/mL. Esse é um achado importante, na medida em que essas concentrações são atingidas em níveis sanguíneos no uso normal desse fármaco (WILLIS et al., 1979). Por outro lado, é interessante notar que nas amostras em que o diclofenaco induziu produção de biofilme, isto foi acompanhado de expressiva redução do crescimento bacteriano. Por exemplo, na concentração de 50 µg/mL, essa redução variou de 30,9 a 58,1% para as amostras clínicas, e de 23,8 a 51,7% para as de portadores.

As amostras de *S. aureus* nas quais o diclofenaco induziu produção de biofilme foram avaliadas quanto à composição da matriz do biofilme, indiretamente, através do grau de degradação após tratamento com solução de metaperidato de sódio (FRANK; PATEL, 2007). O metaperidato é um agente oxidante capaz de quebrar ligações 1-6 de polímeros de glicosamina como a PIA (poli-N-acetil-(1→6)-β-D-glucosamina), sendo, portanto, eficaz na desagregação de biofilme polissacarídico, ao contrário dos biofilmes não-polissacarídicos, que mostram-se resistentes a esse tratamento.

Todas as catorze amostras biofilme-induzidas pelo diclofenaco em TSB apresentaram matriz com composição não-polissacarídica. Esse resultado sugere, portanto, que a droga atua ativando via(s) *ica* (PIA)-independente(s) para a produção de biofilme. De fato, testes complementares mostraram que o biofilme induzido apresentou composição proteica na maioria desses isolados, enquanto em alguns a composição da matriz foi de DNA, ou DNA-proteína (dados não mostrados). Estes resultados foram presumidos após a execução de testes com soluções de tripsina e proteinase K, enzimas que degradam biofilme com matriz de composição proteica, e solução de DNase, que desagrega biofilmes constituídos majoritariamente por DNA extracelular (CHAIGNON et al., 2007; IZANO et al., 2008).

Apesar de todas as catorze amostras biofilme-induzidas pelo diclofenaco terem apresentado matriz com composição não-polissacarídica, é preciso ressaltar o comportamento da amostra SA16, pertencente ao grupo de seis isolados que apresentou capacidade de produzir biofilme em TSB na ausência do diclofenaco. Nesse isolado o diclofenaco em concentração tão baixa quanto 3 µg/mL aumentou a quantidade de biofilme produzido, sendo que tanto na ausência quanto na presença da droga o biofilme apresentou composição polissacarídica. Esse resultado sugere,

assim, que em alguns casos a droga pode estimular também a via *ica* (PIA) - dependente, de modo a aumentar a produção de biofilme.

Biofilmes com matriz extracelular de composição proteica têm sido mais associados a amostras MRSA (SPEZIALE et al, 2014). No grupo de vinte amostras clínicas de *S. aureus* testadas para o diclofenaco, sete eram MRSA. Porém, nenhum desses isolados fez parte do grupo de sete amostras que apresentaram indução para produção de biofilme pelo diclofenaco.

Não existem outros estudos referentes à natureza química de biofilmes induzidos pelo diclofenaco, até porque, como já enfatizado, investigações conduzidas por outros autores tem se concentrado no potencial efeito anti-biofilme que essa droga pode apresentar. No entanto, vale a pena destacar o estudo de Dotto et al., (2017) com o AINE ácido salicílico (AS), o principal biometabólito do ácido acetilsalicílico. Esses autores mostraram que o AS promoveu a formação de biofilme em *S. aureus* de uma maneira PIA-dependente, produzindo, portanto, biofilme polissacarídico. Nesse caso, o aumento da expressão de PIA, entre outros fatores, envolveu uma diminuição da biodisponibilidade de ferro, decorrente da moderada capacidade quelante desse metal pelo AS, além do fato do AS afetar negativamente a transcrição do gene *codY*, cujo produto codificado (CodY) atua como um repressor de *ica*.

Com base em imagens de Microscopia Eletrônica de Varredura, duas amostras de *S. aureus* foram escolhidas para uma avaliação estrutural do biofilme induzido pelo diclofenaco. Em ambas os isolados, o controle (cultura obtida em TSB sem diclofenaco) revelou presença de raras células aderidas à superfície do biopolímero. Ao contrário, nas amostras crescidas em TSB com diclofenaco foram observados extensos agregados de células aderidas, confirmando os resultados obtidos pela técnica da placa de microtitulação. Nas imagens magnificadas do biofilme produzido por essas amostras foi notada a presença de muito pouco material extracelular, o que está de acordo com um biofilme de natureza não-polissacarídica. Segundo Vergara-Irigaray et al., (2009), a morfologia das células visualizadas por microscopia eletrônica de varredura em uma matriz de biofilme rica em PIA / PNAG é bastante distinta do biofilme envolvendo proteínas. Enquanto no primeiro, as bactérias estão embebidas em abundante material extracelular amorfo, as células de um biofilme dependente de proteína estão em contato próximo, sem uma matriz extracelular apreciável.

Quatro dos isolados positivos para indução de biofilme pelo diclofenaco foram avaliados quanto ao efeito da combinação do AINE com outras substâncias indutoras de biofilme. As amostras escolhidas foram SA12, B03, SA50 e SA39. O principal objetivo destes testes foi investigar eventuais mudanças na composição da matriz do biofilme induzido pela combinação das substâncias, e avaliar qual a via que se sobrepõe, se PIA-dependente ou PIA-independente.

Com exceção do isolado SA39, SUB-CMIs de rifampicina (CMI/2) induziram produção de biofilme em quantidade muito superior à observada para a indução pelo diclofenaco. O aumento, em média, foi de cerca de 190% (dados não mostrados), denotando, portanto, uma capacidade estimulatória para produção de biofilme muito maior que a observada para o AINE somente. Por outro lado, a combinação das duas drogas determinou um aumento médio na produção de biofilme que variou cerca de 30 a 45%, em relação à rifampicina somente, indicando assim, uma ação sinérgica das duas drogas. Ao contrário do que foi observado para o diclofenaco somente, o biofilme induzido pela rifampicina, bem como pela associação das duas drogas, foi de composição polissacarídica. Isso sugere, portanto, que a ativação da via *ica*-dependente promovida pela rifampicina foi intensa o suficiente para se sobrepôr ao estímulo *ica*-independente implementado pelo diclofenaco. A composição polissacarídica do biofilme induzido por SUB-CMIs de rifampicina em *S. aureus* é um resultado que está de acordo com aquele obtido por Limae-Silva et al., (2017).

A adição de 1% de glicose ao TSB promoveu indução de produção de biofilme em todos os quatro isolados estudados, tendo este se mostrado resistente à desagregação pelo metaperiodato, o que indicou sua composição não-polissacarídica. O resultado se manteve quando esse açúcar foi testado em associação com o diclofenaco. Portanto, ambas as substâncias parecem ativar uma via PIA-independente para produção de biofilme. Diferentes autores tem apontado a capacidade da glicose para ativar uma via *ica*-independente para produção de biofilme, porém, tais estudos tem enfatizado mais este efeito em relação a amostras MRSA (FITZPATRICK; HUMPHREYS; O'GARA, 2005; O'NEILL et al., 2007)

Quanto ao efeito do NaCl, em um dos isolados não foi observada indução para produção de biofilme, e a combinação do sal com diclofenaco ainda inibiu a produção do biofilme induzido pelo AINE nessa amostra. Em dois isolados (B03 e SA50) o NaCl induziu formação de biofilme de composição polissacarídica, resultado que se mostrou

concordante com os obtidos por outros autores, que apontaram as condições de estresse osmótico geradas por esse sal como um fator indutor para produção de biofilme PIA-dependente (O'NEILL et al., 2007; O'NEILL et al., 2008; VERGARA-IRIGARAY et al., 2009). Isso é uma decorrência da capacidade desse sal atuar como um ativador de transcrição do operon *ica* (RACHID et al., 2000; (FITZPATRICK; HUMPHREYS; O'GARA, 2005).

É interessante notar que, quando os isolados B03 e SA50 foram crescidos no meio com a combinação das drogas, o biofilme polissacarídico induzido pelo NaCl apresentou uma composição mais próxima do controle produtor de biofilme não-polissacarídico induzido pelo diclofenaco. Nesse caso, portanto, a via *ica-dependente* não parece predominar.

Ao contrário desses dois isolados, a amostra SA39 produziu biofilme não-polissacarídico, tanto no cultivo somente com NaCl quanto na presença do sal associado ao diclofenaco. Isso indica que essa amostra pode ter uma mesma via para produção de biofilme não-polissacarídico, que é ativada por ambas as substâncias.

6 CONCLUSÕES

As amostras clínicas e de portadores de *S. aureus* apresentarem valores de CMI para o diclofenaco entre 200 e 400 µg/mL, enquanto a CMB mostrou-se maior que 800 µg/mL.

O diclofenaco induziu produção de biofilme em trinta e cinco por cento dos isolados testados (14 amostras), resultado que pode ser considerado inédito, uma vez a ação dessa droga tem sido descrita como anti-biofilme. Em um dos isolados a indução de biofilme ocorreu em concentrações muito baixas da droga (1,5 e 3,0µg/mL).

Mesmo nas amostras de *S. aureus* capazes de produzir biofilme polissacarídico, o diclofenaco induziu exclusivamente a produção de biofilme não-polissacarídico, indicando, portanto, que essa droga ativa somente uma via do tipo *ica*-independente. Por outro lado, a droga pode estimular o aumento da produção de biofilme polissacarídico em amostras naturalmente produtoras de biofilme polissacarídico em TSB.

Nas amostras biofilme-induzidas pelo diclofenaco, a concentração da droga cujo efeito de indução se estendeu a todos os isolados foi de 50µg/mL. O efeito indutor para biofilme nessa concentração foi acompanhado de redução das taxas de crescimento das amostras, que variou de 23 a 58%.

Em algumas amostras estudadas, SUB-CMIs de rifampicina induziram forte produção de biofilme polissacarídico, resultado que não se alterou quando o antimicrobiano foi testado de modo associado ao diclofenaco. NaCl também induziu biofilme polissacarídico em alguns isolados, mas em parte destes a composição do biofilme mudou para não-polissacarídica quando esse sal foi combinado ao diclofenaco. Por outro lado, em uma amostra o NaCl induziu biofilme não-polissacarídico, tanto isoladamente quanto na combinação com o AINE. Para a glicose, em ambas as situações, todos os isolados estudados apresentaram biofilme não-polissacarídico. Esses resultados, portanto, indicam que o nível de estimulação varia para a ativação de uma via *ica*-dependente ou *ica*-independente para produção de biofilme, e denota a capacidade do micro-organismo para alternar a composição da matriz do biofilme, dependendo das condições ambientais.

São necessários mais estudos acerca do efeito indutor do diclofenaco de sódio na produção de biofilme por amostras de *S. aureus*, tendo em vista que as publicações existentes descrevem apenas o efeito bactericida e antibiofilme da droga.

REFERÊNCIAS

ABBAS, H. A. Inhibition of Virulence Factors of *Pseudomonas Aeruginosa* by Diclofenac Sodium. **Roum Arch Microbiol Immunol**, v. 74, n. 3–4, p. 79–85, 2015.

ABBAS, H. A.; SERRY, F. M.; EL-MASRY, E. M. Combating *Pseudomonas aeruginosa* biofilms by potential biofilm inhibitors. **Asian Journal of Research in Pharmaceutical Science**, v. 2, n. 2, p. 66–72, 2012.

AGARWAL, A.; JAIN, A. Glucose & sodium chloride induced biofilm production & ica operon in clinical isolates of staphylococci. **Indian Journal of Medical Research**, v. 138, n. 2, p. 262–266, 2013.

AHMED, E. F. et al. Antibacterial Activity of Some Non-steroidal Anti-inflammatory Drugs against Bacteria Causing Urinary Tract Infection. **American Journal of Infectious Deases and Microbiology**, v. 5, n. 1, p. 66–73, 2017.

AL-JANABI, A. A. H. S. Comparison of the disc diffusion assay with spectrophotometer technique for antibacterial activity of diclofenac sodium, indomethacin and mefenamic acid ResearchGate. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 74, n. 12, p. 3745–3748, 2016.

ALQAHTANI, F. Y. et al. Preparation, characterization, and antibacterial activity of diclofenac-loaded chitosan nanoparticles. **Saudi Pharmaceutical Journal**, 2018.

ALVIM, A. L. S.; SANTOS, F. C. R. Medidas de precaução de contato para prevenção e controle de infecções: Relato de experiência. **Revista de Enfermagem do Centro-Oeste Mineiro**, v. 7, n. 0, 8 jul. 2017.

ANNANDURAI, S. et al. Experimental studies on synergism between aminoglycosides and the antimicrobial antiinflammatory agent diclofenac sodium. **Journal of chemotherapy**, v. 14, n. 1, p. 47–53, 2002.

APARNA, M. S.; YADAV, S. Biofilms: microbes and disease. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 12, n. 6, p. 526–530, 2008.

ARCHER, N. K. et al. *Staphylococcus aureus* biofilms: properties, regulation, and roles in human disease. **Virulence**, v. 2, n. 5, p. 455–459, 2011.

ARCIOLA, C. R. et al. Biofilm formation in *Staphylococcus* implant infections. A review of molecular mechanisms and implications for biofilm-resistant materials. **Biomaterials**, v. 33, n. 26, p. 5967–5982, set. 2012.

ATSHAN, S. S. et al. Prevalence of adhesion and regulation of biofilm-related genes in different clones of *Staphylococcus aureus*. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, v. 2012, n. June 2016, 2012.

BALDIRIRS, R. et al. Anti-biofilm activity of ibuprofen and diclofenac against some biofilm producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* uropathogens. **African Journal of Microbiology Research**, v. 10, n. 40, p. 1675–1684, 2016.

BATLOUNI, M. Anti-Inflamatórios Não Esteroides: Efeitos Cardiovasculares, Cérebro-Vasculares e Renais. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 94, n. 4, p. 556–563, 2010.

BECKER, K.; HEILMANN, C.; PETERS, G. Coagulase-Negative Staphylococci. **Clinical microbiology reviews**, v. 27, n. 4, p. 870–926, 2014.

BIEN J.; SOKOLOVA, O.; BOZKO, P. Characterization of virulence factors of *Staphylococcus aureus*: Novel function of known virulence factors that are implicated in activation of airway epithelial proinflammatory response. **Journal of Pathogens** 2011.

BOLES, B. R.; HORSWILL, A. R. agr-Mediated Dispersal of *Staphylococcus aureus* Biofilms. **PLOS Pathogens**, v. 4, n. 4, 2008.

BOSHIWI, S. S.; UDO, E. E. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: an update on the epidemiology, treatment options and infection control. **Current Medicine Research and Practice**, v. 8, n. 1, p. 18–24, 2018.

BOYLE-VAVRA, S.; DAUM, R. S. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: the role of Pantón–Valentine leukocidin. **Laboratory Investigation**, v. 87, n. 1, p. 3–9, jan. 2007.

CARVALHO, W. A. et al. **Analgésicos Inibidores Específicos da Ciclooxygenase-2: Avanços Terapêuticos * Specific Cyclooxygenase-2 Inhibitor Analgesics: Therapeutic Advances**. [s.l.: s.n.]. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/rba/v54n3/v54n3a17.pdf>>. Acesso em: 21 nov. 2018.

CASEY, A. L.; LAMBERT, P. A.; ELLIOTT, T. S. J. Staphylococci. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 29 Suppl 3, p. S23-32, maio 2007.

CERCA, N.; BROOKS, J. L.; JEFFERSON, K. K. Regulation of the intercellular adhesin locus regulator (*icaR*) by *SarA*, *sigmaB*, and *IcaR* in *Staphylococcus aureus*. **Journal of bacteriology**, v. 190, n. 19, p. 6530–6533, 2008.

CHAIGNON, P. et al. Susceptibility of staphylococcal biofilms to enzymatic treatments depends on their chemical composition. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 75, n. 1, p. 125–132, abr. 2007.

CHAN, E. W. L. et al. Synergistic effect of non-steroidal anti-inflammatory drugs (AINE) on antibacterial activity of cefuroxime and chloramphenicol against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Journal of Global Antimicrobial Resistance**, v. 10, p. 70–74, 2017.

CHEUNG, A. L. Global regulation of virulence determinants in *Staphylococcus Aureus* by the *SarA* protein family. **Frontiers in Bioscience**, v. 7, n. 1–3, p. d1825, ago. 2002.

CHRISTENSEN, G. D. et al. Adherence of Coagulase-Negative Staphylococci to Plastic Tissue Culture Plates: a Quantitative Model for the Adherence of Staphylococci to Medical Devices. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 22, n. 6, p. 996–1006, 1985.

CONLON, K. M.; HUMPHREYS, H.; O’GARA, J. P. Inactivations of *rsbU* and *sarA* by IS256 represent novel mechanisms of biofilm phenotypic variation in *Staphylococcus epidermidis*. **Journal of bacteriology**, v. 186, n. 18, p. 6208–6219, 2004.

COSTERTON, W. et al. Journal of Clinical Investigation -- The application of biofilm science to the study and control of chronic bacterial infections. **The journal of Clinical Investigation**, v. 112, n. 10, 2003.

CRAMTON, S. E. et al. The intercellular adhesion (*ica*) locus is present in *Staphylococcus aureus* and is required for biofilm formation. **Infection and immunity**, v. 67, n. 10, p. 5427–5433, 1999.

CUCARELLA, C. et al. *Bap*, a *Staphylococcus aureus* surface protein involved in biofilm formation. **Journal of Bacteriology**, v. 183, n. 9, p. 2888–96, maio 2001.

DARWISH, R. M.; ABURJAI, T.; HADIDI, K. The Effect of COX1 and COX2 Inhibitors on the Antibacterial Activity of Selected Antibiotics against Standard and Methicillin- Resistant *Staphylococcus aureus*. **Jordan Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 2, n. 1, p. 76–85, 2009.

DASTIDAR, S. G. et al. The antibacterial action of diclofenac shown by inhibition of DNA synthesis. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 14, n. 3, p. 291–251, 2000.

DEIGHTON, M. A.; BALKAU, B. Adherence Measured by Microtiter Assay as a Virulence Marker for *Staphylococcus epidermidis* Infections. v. 28, n. 11, p. 2442–2447, 1990.

DEIGHTON, M.; BORLAND, R. Regulation of slime production in *Staphylococcus epidermidis* by iron limitation. **Infection and immunity**, v. 61, n. 10, p. 4473–4479, 1993.

DENGLER, V. et al. An Electrostatic Net Model for the Role of Extracellular DNA in Biofilm Formation by *Staphylococcus aureus*. **Journal of Bacteriology**, v. 197, n. 24, p. JB.00726-15, set. 2015.

DONLAN, R. M.; COSTERTON, W. Biofilms: Survival Mechanisms of Clinically Relevant Microorganisms. **Clinical microbiology reviews**, v. 15, n. 2, p. 167–193, 2002.

DORIA, A. C. O. C. et al. Estudo Comparativo De Hemoculturas E Cateteres Positivos Para Leveduras Do Gênero *Candida* De Origem Hospitalar. **Revista Univap**, v. 21, n. 38, p. 46–55, 2016.

DOTTO, C. et al. The active component of aspirin, salicylic acid, promotes *Staphylococcus aureus* biofilm formation in a PIA-dependent manner. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, n. 4, 2017.

DUNNE, W. M. J. Bacterial Adhesion: Seen Any Good Biofilms Lately? **Clinical Microbiology Reviews**, v. 15, n. 2, p. 155–166, 2002.

DUTTA, N. K. et al. Antimycobacterial activity of the antiinflammatory agent diclofenac sodium, and its synergism with streptomycin. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 35, n. 4, p. 316–323, 2004.

EL-BAKY, R. M.; EL-GENDY, S. G. Effect of non-steroidal anti-inflammatory drugs and dexamethazone on the biofilm formation and expression of some adhesion-related genes of *Candida albicans* and *Staphylococcus aureus*. **African Journal of Microbiology Research**, v. 10, p. 694–707, 2016.

FERNANDES, H. M. Z. Influência de Concentrações Não Inibitórias de Rifampicina, Minociclina e Etanol na Produção de Biofilme por *Staphylococcus aureus*. 2014. 69 f. Trabalho de Conclusão de curso (Graduação em Biomedicina) - Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro, 2016.

FEY, P. D. et al. Characterization of the relationship between polysaccharide intercellular adhesin and hemagglutination in *Staphylococcus epidermidis*. **Journal of Infectious Diseases**, v. 179, n. 6, p. 1561–1564, 1999.

FITZPATRICK, F.; HUMPHREYS, H.; O'GARA, J. P. Evidence for icaADBC-independent biofilm development mechanism in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical isolates. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, n. 4, p. 1973–1976, 2005.

FRANK, K. L.; PATEL, R. Poly-N-acetylglucosamine is not a major component of the extracellular matrix in biofilms formed by icaADBC-positive *Staphylococcus lugdunensis* isolates. **Infection and immunity**, v. 75, n. 10, p. 4728–42, out. 2007.

FREEMAN, D. J.; FALKINER, F. R.; PATRICK, S. FREEMAN; FALKINER; KEANE, 1989.pdf. **Journal of clinical pathology**, p. 872–874, 1989.

FREITAS, R .P. et al. Effect of the Association of Nonsteroidal Anti-inflammatory and Antibiotic Drugs on 171 Antibiofilm Activity and pH of Calcium Hydroxide Pastes. **Journal of endodontics**. v. 43, n1, p. 131-134, 2017.

GERKE, C. et al. Characterization of the N-Acetylglucosaminyltransferase Activity Involved in the Biosynthesis of the *Staphylococcus epidermidis* Polysaccharide Intercellular Adhesin. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 273, n. 29, p. 18586–18593, 1998.

GILDO, M. G. P. et al. AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA ANTIMICROBIANA DE DESINFETANTES UTILIZADOS NA ROTINA DE LIMPEZA HOSPITALAR. **Revista Expressão Católica Saúde**, v. 2, n. 2, p. 34–39, 1 ago. 2018.

GORDON, R. J.; LOWY, F. D. Pathogenesis of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Infection. **Clinical Infectious Diseases**, v. 46, n. S5, p. S350–S359, jun. 2008.

GÖTZ, F. *Staphylococcus* and biofilms. **Molecular Microbiology**, v. 43, n. 6, p. 1367–1378, 2002.

GUO, B. et al. Pathogenic implication of a fibrinogen-binding protein of *Staphylococcus epidermidis* in a rat model of intravascular-catheter-associated infection. **Infection and immunity**, v. 75, n. 6, p. 2991–2995, 2007.

HASSAN, A. et al. Evaluation of different detection methods of biofilm formation in the clinical isolates. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 15, n. 4, p. 305–311, ago. 2011.

HEGAZY, W. A. H. Diclofenac inhibits virulence of *Proteus mirabilis* isolated from diabetic foot ulcer. **African Journal of Microbiology Research**, v. 10, p. 733–743, 2016.

HENNEKINNE, J.-A.; DE BUYSER, M.-L.; DRAGACCI, S. *Staphylococcus aureus* and its food poisoning toxins: characterization and outbreak investigation. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 36, n. 4, p. 815–836, jul. 2012.

HILÁRIO, M. O. E.; TERRERI, M. T.; LEN, C. A. Antiinflamatórios não-hormonais: inibidores da ciclooxigenase 2. **Jornal de Pediatria**, v. 82, n. 5, p. S206–S212, nov. 2006.

HOUSTON, P. et al. Essential Role for the Major Autolysin in the Fibronectin-Binding Protein-Mediated *Staphylococcus aureus* Biofilm Phenotype. **Infection and Immunity**, v. 79, n. 3, p. 1153–1165, mar. 2011.

IZANO, E. A. et al. Differential roles of poly-N-acetylglucosamine surface polysaccharide and extracellular DNA in *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* biofilms. **Applied and environmental microbiology**, v. 74, n. 2, p. 470–6, jan. 2008.

JACQUELINE, C.; CAILLON, J. Impact of bacterial biofilm on the treatment of prosthetic joint infections. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 69, n. suppl 1, p. i37–i40, 1 set. 2014.

KAPLAN, J. B. Antibiotic-induced biofilm formation. **International Journal of Artificial Organs**, v. 34, n. 9, p. 737–751, 2011.

KIEM, S. et al. Phase variation of biofilm formation in *Staphylococcus aureus* by IS256 insertion and its impact on the capacity adhering to polyurethane surface. **Journal of Korean Medical Science**, v. 19, n. 6, p. 779–82, 2004.

KIM, J. H.; HACKER, J.; LEE, B. K. Molecular characterization of regulatory genes associated with biofilm variation in a *Staphylococcus aureus* strain. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 18, n. 1, p. 28–34, 2008.

KNOBLOCK, J. K. et al. Biofilm formation by *Staphylococcus epidermidis* depends on functional RsbU, an activator of the sigB operon: differential activation mechanisms due to ethanol and salt stress. **Journal of Bacteriology**, v. 183, n. 18, p. 2624–2633, 2001.

KNOBLOCK, J. K. et al. Evaluation of different detection methods of biofilm formation in *Staphylococcus aureus*. **Medical Microbiology and Immunology**, v. 191, n. 2, p. 101–106, 2002.

KREPSKY, N. et al. Cell surface hydrophobicity and slime production of *Staphylococcus epidermidis* Brazilian isolates. **Current Microbiology**, v. 46, n. 4, p. 280–286, 2003.

KRISTIANSEN, J.E. Experiments to illustrate the effect of chlorpromazine on the permeability of the bacterial cell wall. **Acta Pathologica et Microbiologica Scandinavica. Section B, Microbiology** v. 87, n. 317-319, 1979

KRISTIANSEN, J.E. The antimicrobial activity of non-antibiotics. Report from a congress on the antimicrobial effect of drugs other than antibiotics on bacteria, viruses protozoa, and other organism, 1992

LAWRENCE, J. R.; NEU, T. R. Confocal laser scanning microscopy for analysis of microbial biofilms. **Methods in Enzymology**, v. 310, p. 131–144, 1999.

LIM, Y. et al. Control of glucose- and NaCl-induced biofilm formation by *rbf* in *Staphylococcus aureus*. **Journal of bacteriology**, v. 186, n. 3, p. 722–9, fev. 2004.

LIMA-E-SILVA, A. A. et al. Sub-Inhibitory Concentrations of Rifampicin Strongly Stimulated Biofilm Production in. **The Open Microbiology Journal**, v. 11, n. 1, p. 142–151, 2017.

LIMA-E-SILVA, A. A.; SILVA, P. S. Non-Antibiotic Compounds : The Activity of the AINE Diclofenac on Bacteria- A Review. **International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences**, v. 7, n. 12, p. 340–351, 2018.

LÖFFLER, B. et al. *Staphylococcus aureus* Panton-Valentine Leukocidin Is a Very Potent Cytotoxic Factor for Human Neutrophils. **PLoS Pathogens**, v. 6, n. 1, p. e1000715, jan. 2010.

LOS, R. et al. A comparative analysis of phenotypic and genotypic methods for the determination of the biofilm-forming abilities of *Staphylococcus epidermidis*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 310, n. 2, p. 97–103, 2010.

MAH, T.-F. C.; O'TOOLE, G. A. Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. **Trends in Microbiology**, v. 9, n. 1, p. 34–39, 2001.

MANNA, A C.; BAYER, M. G.; CHEUNG, A L. Transcriptional analysis of different promoters in the *sar* locus in *Staphylococcus aureus*. **Journal of Bacteriology**, v. 180, n. 15, p. 3828–36, ago. 1998.

MARQUES, S. C. et al. Formation of biofilms by *Staphylococcus aureus* on stainless steel and glass surfaces and its resistance to some selected chemical sanitizers. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 38, n. 3, p. 538–543, 2007.

MARTINEAU, F. et al. Species-specific and ubiquitous-DNA-based assays for rapid identification of *Staphylococcus aureus*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 36, n. 3, p. 618–623, 1998.

MATEO, M. et al. Strong slime production is a marker of clinical significance in *Staphylococcus epidermidis* isolated from intravascular catheters. **European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v. 27, n. 4, 2008.

MATHUR, T. et al. Detection of biofilm formation among the clinical isolates of *Staphylococci*: an evaluation of three different screening methods. **Indian Journal of Medical Microbiology**, v. 24, n. 1, p. 25–29, 2006.

MAZUMDAR, K. et al. Diclofenac in the management of *E. coli* urinary tract infections. **In Vivo**, v. 20, n. 5, p. 613–619, 2006.

MAZUMDAR, K. et al. The anti-inflammatory non-antibiotic helper compound diclofenac: An antibacterial drug target. **European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v. 28, n. 8, p. 881–891, 2009.

MCCREA, K. W. et al. The serine-aspartate repeat (Sdr) protein family in *Staphylococcus epidermidis*. **Microbiology (Reading, England)**, v. 146 (Pt 7, n. 7, p. 1535–46, jul. 2000.

MOHSEN, A. et al. Antibacterial, Anti-biofilm Activity of Some Non-steroidal Anti-Inflammatory Drugs and N-acetyl Cysteine against Some Biofilm Producing Uropathogens. **American Journal of Epidemiology and Infectious Disease**, v. 3, n. 1, p. 1–9, 2015.

MOKS, T. et al. Staphylococcal protein A consists of five IgG-binding domains. **European Journal of Biochemistry**, v. 156, n. 3, p. 637–643, maio 1986.

MURRAY, PATRICK R; ROSENTHAL, KEN S; PFALLER, M. A. **Microbiologia Médica**. 6. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2009.

O'NEILL, E. et al. Association between methicillin susceptibility and biofilm regulation in *Staphylococcus aureus* isolates from device-related infections. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 45, n. 5, p. 1379–1388, 2007.

O'NEILL, E. et al. A Novel Staphylococcus aureus Biofilm Phenotype Mediated by the Fibronectin-Binding Proteins, FnBPA and FnBPB. **Journal of Bacteriology**, v. 190, n. 11, p. 3835–3850, jun. 2008.

OPREA, V.; MOGA, D. Why Should Be Removed Chronic Infected Abdominal Synthetic Meshes? A Review. **Global Journal of Surgery**, v. 17, n. 23, p. 17–23, 2015.

OTTO, M. Staphylococcus epidermidis — the “accidental” pathogen. **Nature Reviews Microbiology**, v. 7, n. 8, p. 555–567, ago. 2009.

OTTO, M. Staphylococcal Infections: Mechanisms of Biofilm Maturation and Detachment as Critical Determinants of Pathogenicity. **Annual Review of Medicine**, v. 64, p. 175–188, 2013.

OTTO, M. Staphylococcus aureus toxins. **Current Opinion in Microbiology**, v. 17, p. 32–37, fev. 2014.

PADMA, R.; YALAVARTHY, D. Screening of Diclofenac for Antibacterial activity against Pathogenic Microorganisms. **International Journal of Advances in Pharmacy, Biology and Chemistry**, v. 4, n. 3, p. 554–558, 2015.

PADOVEZE, MARIA CLARA; FORTALEZA, C. M. C. B. Infecções relacionadas à assistência à saúde: desafios para a saúde pública no Brasil Healthcare-associated infections: challenges to public health in Brazil. **Rev Saúde Pública**, v. 48, n. 6, p. 995–1001, 2014.

PALMER, J.; FLINT, S.; BROOKS, J. Bacterial cell attachment, the beginning of a biofilm. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 34, n. 9, p. 577–588, 2007.

PERILLI, R. et al. Alteration of organized structure of biofilm formed by Staphylococcus epidermidis on soft contact lenses. **Journal of Biomedical Materials Research**, v. 49, n. 1, p. 53–57, 2000.

PROCKT, ANDERSON PEDROSO; WAGNER, JOÃO CARLOS BIRNFELD ; GERHARDT, EDUARDO LUIS; VOLKWEIS, M. R. O uso do diclofenaco sódico e o laser de baixa intensidade após a cirurgia de terceiros molares. **Revista de cirurgia e traumatologia buco-maxilo-facial**, v. 9, n. 3, p. 113–120, 2008.

QIN, Z. et al. Role of autolysin-mediated DNA release in biofilm formation of Staphylococcus epidermidis. **Microbiology**, v. 153, n. 7, p. 2083–2092, 2007.

RACHID, S. et al. Effect of subinhibitory antibiotic concentrations on polysaccharide intercellular adhesin expression in biofilm forming *Staphylococcus epidermidis*. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 44, n. 121, p. 3357–3363, 2000.

RANG, H P; DALE, M M; RITTER, J M; FLOWER, R J; HENDERSON, G. **Farmacologia**. 7. ed. [s.l.] Elsevier, 2011.

REHAB, M. A. E. B.; SHEREIN, G. E. G. Effect of non-steroidal anti-inflammatory drugs and dexamethazone on the biofilm formation and expression of some adhesion-related genes of *Candida albicans* and *Staphylococcus aureus*. **African Journal of Microbiology Research**, v. 10, n. 20, p. 694–707, 2016.

RIORDAN, J. T. et al. Alterations in the transcriptome and antibiotic susceptibility of *Staphylococcus aureus* grown in the presence of diclofenac. **Annals os Clinical Microbiology and Antimicrobials**, v. 10, n. 30, 2011.

ROGERS, K. L.; FEY, P. D.; RUPP, M. E. Coagulase-Negative Staphylococcal Infections. **Infectious Disease Clinics of North America**, v. 23, n. 1, p. 73–98, mar. 2009.

ROHDE, H. et al. Polysaccharide intercellular adhesin or protein factors in biofilm accumulation of *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus aureus* isolated from prosthetic hip and knee joint infections. **Biomaterials**, v. 28, n. 9, p. 1711–1720, 2007.

SADOVSKAYA, I. et al. Extracellular carbohydrate-containing polymers of a model biofilm-producing strain, *Staphylococcus epidermidis* RP62A. **Infection and immunity**, v. 73, n. 5, p. 3007–3017, 2005.

SILVA FILHO, R. G. Produção de biofilme em amostras clínicas de *S. epidermidis*: influência de concentrações subinibitórias de antissépticos (etanol e clorexidina) e associação com potenciais marcadores de virulência. 2014. 154 f. Tese (Doutorado em Vigilância Sanitária)- Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2014.

SHANKS, R. M. Q. et al. Heparin stimulates *Staphylococcus aureus* biofilm formation. **Infection and immunity**, v. 73, n. 8, p. 4596–4606, 2005.

SHARMA, M. et al. Toluidine Blue-Mediated Photodynamic Effects on Staphylococcal Biofilms. **ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY**, v. 52, n. 1, p. 299–305, 2008.

SMITH, K. et al. Biofilm formation by Scottish clinical isolates of *Staphylococcus aureus*. **Journal of Medical Microbiology**, v. 57, p. 1018–1023, 2008.

SPEZIALE, P. et al. Protein-based biofilm matrices in *Staphylococci*. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 4, p. 171, dez. 2014.

STEPANOVIC, SRDJAN; VUKOVIC, DRAGANA; HOLA, VERONIKA; BONAVENTURA, DI GIOVANNI; DJUKIC, SLOBODANKA; CIRKOVIC, IVANA; RUZICK, F. Quantification of biofilm in microtiter plates: overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by staphylococci. **APMIS: Acta Pathologica, Microbiologica, et Immunologica Scandinavica**, v. 115, p. 891–899, 2007.

TAYLOR, T. A.; UNAKAL, C.G. *Staphylococcus Aureus*. In: StatPearls. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2018. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK441868/>>. Acesso em: novembro de 2018

TODD, P. A.; SORKIN, E. M. Diclofenac sodium. A reappraisal of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties and therapeutic efficacy. **Srugs**, v. 35, n. 3, p. 244–285, 1988.

TORMO, M. A. et al. SarA is an essential positive regulator of *Staphylococcus epidermidis* biofilm development. **Journal of bacteriology**, v. 187, n. 7, p. 2348–2356, 2005.

TRABULSI, LUIZ RACHID; ALTERTHUM, F. **Microbiologia**. 5. ed. São Paulo: Atheneu, 2008.

TROTONDA, M. P. et al. SarA Positively Controls Bap-Dependent Biofilm Formation in *Staphylococcus aureus*. **Journal of Bacteriology**, v. 187, n. 16, p. 5790–5798, 2005.

TYSKI, S. **Non-antibiotics - Drugs with additional antimicrobial activity Acta Poloniae Pharmaceutica - Drug Research**, 2003.

UMARU, T. et al. Antimicrobial activity of non-steroidal anti-inflammatory drugs with respect to immunological response: Diclofenac sodium as a case study. **African Journal of Microbiology Research**, v. 8, n. 25, p. 7332–7339, 2009.

VANDENESCH, F. et al. Community-acquired methicillin-resistant *staphylococcus aureus* carrying panton-valentine leukocidin genes: Worldwide emergence. **Emerging Infectious Diseases**, v. 9, n. 8, p. 978–984, 2003.

VERGARA-IRIGARAY, M. et al. Relevant role of fibronectin-binding proteins in

Staphylococcus aureus biofilm-associated foreign-body infections. **Infection and immunity**, v. 77, p. 3978–3991, 2009.

VIANA, A. S. O Efeito do Diclofenaco de Sódio na Produção de Biofilme e Outros Fatores Ligados à Fisiologia e Virulência de Staphylococcus aureus. 2016. 89 f. Trabalho de Conclusão de curso (Graduação em Biomedicina) - Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro, 2016.

VILA, J.; SORIANO, A.; MENSA, J. Bases moleculares de la adherencia microbiana sobre los materiales protésicos. Papel de las biocapas en las infecciones asociadas a los materiales protésicos. **Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica**, v. 26, n. 1, p. 48–55, 2008.

VINCENT, J. L. et al. International study of the prevalence and outcomes of infection in intensive care units. **JAMA**, v. 302, n. 21, p. 2323–2329, 2009.

VUONG, C. et al. Impact of the agr Quorum-Sensing System on Adherence to Polystyrene in Staphylococcus aureus. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 182, n. 6, p. 1688–1693, dez. 2000.

VUONG, C. et al. Polysaccharide intercellular adhesin (PIA) protects Staphylococcus epidermidis against major components of the human innate immune system. **Cellular Microbiology**, v. 6, n. 3, p. 269–275, 2004.

WATERS, C. M.; BASSLER, B. L. Quorum sensing: Cell-to-Cell Communication in Bacteria. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, v. 21, n. 1, p. 319–346, 2005.

WILLIS, J. V et al. The pharmacokinetics of diclofenac following intravenous and oral administration. **European Journal of Clinical Pharmacology**, v. 16, n. 6, p. 405–410, 1979.

WISPLINGHOFF, H. et al. Related Clones Containing SCCmec Type IV Predominate among Clinically Significant Staphylococcus epidermidis Isolates. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 47, n. 11, p. 3574–3579, nov. 2003.

YAN, X. et al. Characterization of Staphylococcus aureus strains associated with food poisoning in Shenzhen, China. **Applied and environmental microbiology**, v. 78, n. 18, p. 6637–42, set. 2012.

YIN, Z. et al. DNA replication is the target for the antibacterial effects of nonsteroidal anti-inflammatory drugs. **Chemistry & Biology**, v. 21, n. 4, p. 481–487, 2014.

ZIMMERMANN, PETRA; CURTIS, N. Antimicrobial Effects of Antipyretics. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 61, n. 4, p. 1–12, 2017.

ZOLTAI, P. T.; ZOTTOLA, E. A.; MCKAY, L. L. Scanning Electron Microscopy of Microbial Attachment to Milk Contact Surfaces. **Journal of Food Protection**, v. 44, n. 3, p. 204–208, 1980.

APÊNDICES

APÊNDICE 1: Concentração Mínima Inibitória (CMI) do diclofenaco para 50 amostras de *S. aureus* de origem clínica e de portadores

Amostras de Portadores	CMI ($\mu\text{g/mL}$)	Amostras Clínicas	CMI ($\mu\text{g/mL}$)
B01	400	SA01	200
B02	200	SA03	200
B03	400	SA06	200
B04	200	SA08	200
B05	200	SA09	200
B06	400	SA10	400
B07	400	SA06	400
B11	200	SA12	400
B12	400	SA13	200
B13	400	AS14	200
B17	400	SA15	400
B20	400	SA16	400
B21	200	SA17	200
B32	400	SA18	400
B33	200	SA19	200
B39	400	SA20	200
B43	400	SA21	200
B44	400	SA24	200
B45	200	SA25	200
B47	200	SA33	400
B56	400	SA39	400
B58	400	SA41	200

(Continuação)

Amostras de Portadores	CMI ($\mu\text{g/mL}$)	Amostras Clínicas	CMI ($\mu\text{g/mL}$)
B61	200	SA41	200
B66	200	SA47	400
B68	200	SA50	400

Fonte: o autor

Nota:

*CMI: concentração mínima inibitória

ANEXOS**ANEXO 1 - Termo de consentimento livre e esclarecido**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO BIOMÉDICO
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA E PARASITOLOGIA**

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Eu _____ concordo em participar da pesquisa **“Aspectos de Virulência e Resistência a Antimicrobianos em Amostras de Estafilococos”**, que tem por objetivo isolar amostras de *Staphylococcus aureus* a partir das cavidades nasais de estudantes da área de saúde visando caracterizar o estado de portador. Portanto concordo que sejam coletadas amostras das minhas cavidades nasais e permito que todas as informações obtidas sejam utilizadas para fins exclusivamente científicos. Estou ciente de que meus direitos serão assegurados, que meus dados pessoais não serão divulgados e que posso recusar a fornecer quaisquer dados no momento que desejar, sem que isso me traga constrangimento de alguma natureza. Tenho conhecimento que sou voluntário, não serei remunerado e nem prejudicado em qualquer aspecto. Desta forma estarei contribuindo para ampliar o conhecimento científico.

Rio de Janeiro, ____ de _____ de _____.

Assinatura do Participante