

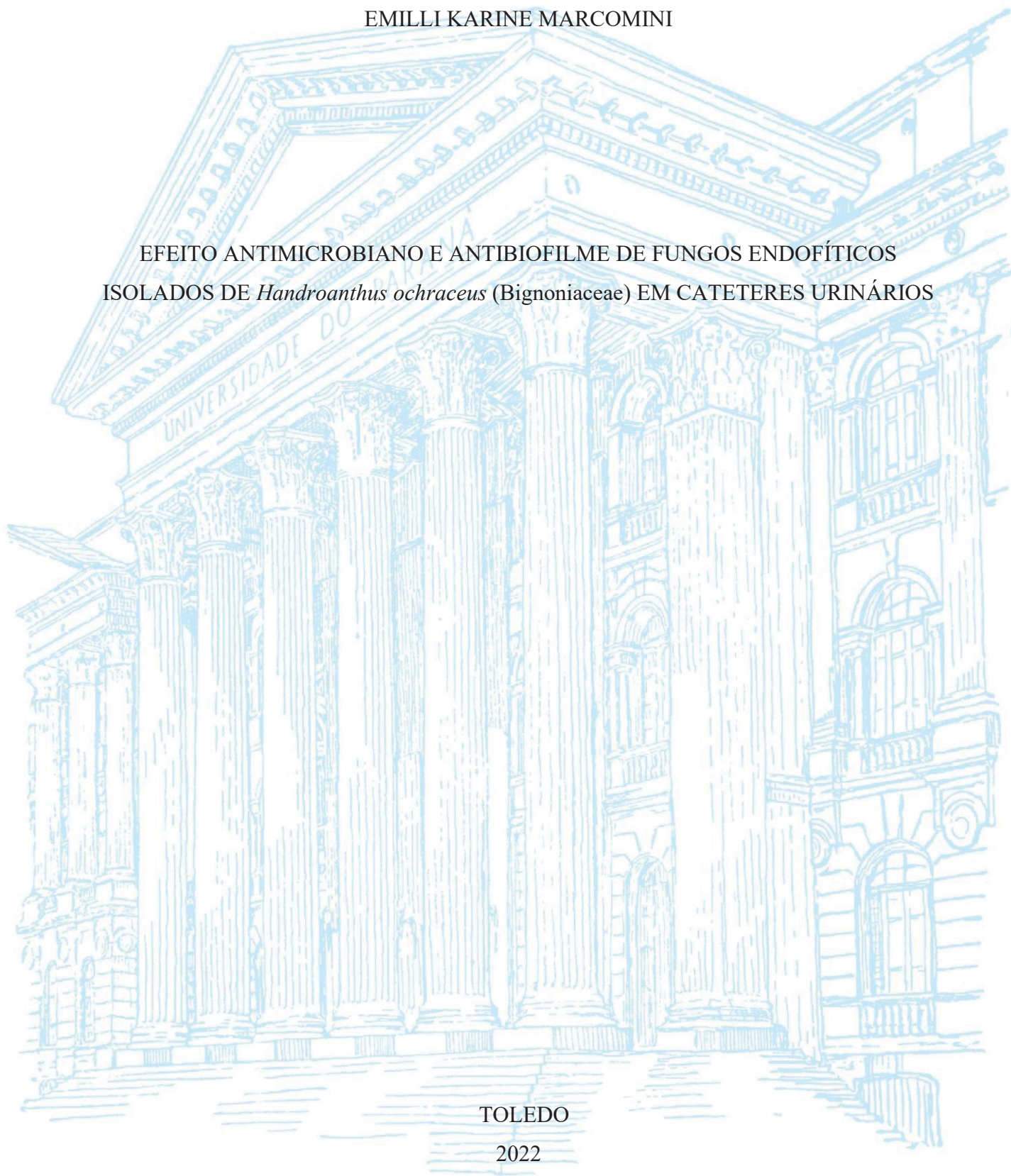
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

EMILLI KARINE MARCOMINI

EFEITO ANTIMICROBIANO E ANTIBIOFILME DE FUNGOS ENDOFÍTICOS
ISOLADOS DE *Handroanthus ochraceus* (Bignoniaceae) EM CATETERES URINÁRIOS

TOLEDO

2022



EMILLI KARINE MARCOMINI

EFEITO ANTIMICROBIANO E ANTIBIOFILME DE FUNGOS ENDOFÍTICOS
ISOLADOS DE *Handroanthus ochraceus* (Bignoniaceae) EM CATETERES URINÁRIOS

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia, Setor Palotina, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Orientadora: Prof. Dra. Juliana Bernardi Wenzel.

TOLEDO

2022

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Marcomini, Emilli Karine

M321 Efeito antimicrobiano e antibiofilme de fungos endofíticos isolados de *Handroanthus ochraceus* (Bignoniaceae) em cateteres urinários / Emilli Karine Marcomini – Palotina, 2022.
93 f.

Orientadora: Juliana Bernardi Wenzel

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Paraná, Setor Palotina, Programa de Pós-graduação em Biotecnologia.

1. Biofilmes. 2. Compostos fitoquímicos. 3. Endófitos. 4. Infecções urinárias. 5. Produtos biológicos. I. Wenzel, Juliana Bernardi. II. Universidade Federal do Paraná. III. Título.

CDU 602

Ficha catalográfica elaborada por Liliane Cristina Soares Sousa – CRB 9/1736



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SETOR PALOTINA
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO BIOTECNOLOGIA -
40001016083P6

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação BIOTECNOLOGIA da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da dissertação de Mestrado de **EMILLI KARINE MARCOMINI** intitulada: **EFEITO ANTIMICROBIANO E ANTIBIOFILME DE FUNGOS ENDOFÍTICOS ISOLADOS DE *Handroanthus ochraceus* (Bignoniaceae) EM CATETERES URINÁRIOS**, sob orientação da Profa. Dra. JULIANA BERNARDI WENZEL, que após terem inquirido a aluna e realizada a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

A outorga do título de mestra está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

PALOTINA, 23 de Fevereiro de 2022.

Assinatura Eletrônica

24/02/2022 10:55:08.0

JULIANA BERNARDI WENZEL

Presidente da Banca Examinadora

Assinatura Eletrônica

24/02/2022 12:29:49.0

HELTON JOSE ALVES

Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Assinatura Eletrônica

24/02/2022 14:09:06.0

TATIANA SHIOJI TIUMAN

Avaliador Externo (UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ)

Dedico esse trabalho a minha família: Valdir, Irene, Eryka e Vitor. Vocês são essenciais na minha vida.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Deus por ter me guiado, sustentado e iluminado nessa jornada. Foram dois anos de muito estudo e dedicação, aos quais necessitei estar em conexão espiritual com Deus, Anjos e Santos para poder superar as dificuldades e obstáculos. Tenho a certeza de que estive comigo durante a escrita da dissertação, entreguei cada palavra a ti e o resultado será promissor.

Aos meus pais Valdir e Irene, sinônimos do amor de Deus aqui na Terra, obrigada pela ajuda financeira, material, amorosa e por tudo, não tenho palavras para descrever o quanto vocês significam para mim e o quanto sou grata por terem a presença e apoio de vocês. Obrigada por me encorajar e acreditar em meu potencial, carrego dívidas de vocês, sou reflexo dessa união. Agradeço por me ensinarem a batalhar por meus objetivos, a lutar por sonhos. São um exemplo.

Aos meus irmãos Eryka e Vitor, por serem minha fonte de alegria e fortaleza. Quantas vezes vocês foram o motivo do meu sorriso, me fizeram ser forte. Eu amo imensamente vocês e agradeço por tê-los comigo. Tenho orgulho de ser irmã de vocês, meus lindos.

Aos meus avós Maternos, que são meus padrinhos de batismo, tanto se preocuparam com minha saúde física, psíquica e emocional, rezaram por mim, superei muitas dificuldades por vocês. Aos meus avós Paternos, agradeço ser da descendência de vocês, ter a oportunidade de estudar e cursar ensino superior, obrigada por tudo.

A toda família Rezini e Marcomini, tias, tios, primos e primas que também fizeram parte deste mestrado e são parte de mim, obrigada por serem a minha família com muito orgulho.

Ao meu namorado Rodrigo, obrigada por me apoiar, confiar e acreditar em meu potencial quando me sentia fraca e pequena. Seu consolo me fez chegar até aqui e trilhar caminhos. Você sempre me dizia: “tudo vai dar certo, você vai conseguir”. Agradeço por sonhar comigo e me permitir viver tudo isso. Nós dois sempre.

A minha orientadora Prof. Dra. Juliana, obrigada pelas valiosas contribuições, ensinamentos, por me ensinar a amar a Microbiologia e ter a certeza a cada dia da beleza da ciência para saúde humana.

As bancas escolhidas para defesa, Prof. Dra. Tatiana e Prof. Dr. Helton, obrigada por aceitarem o convite de fazerem parte desta dissertação, tenho a convicção de que muito contribuirão.

A Laurita Kienen, terapeuta e coaching, obrigada por estabilizar minha saúde mental e ansiedade, não me esqueço de seus ensinamentos e carrego todas as lições que superei com sua ajuda.

Aos colegas que adquiri na pesquisa científica, Fernanda, Eduardo, Flávia, Manuela e Luís, dividimos espaço de conhecimento, aprendi e ensinei a vocês. Obrigada.

A Universidade Paranaense, Curso de Enfermagem, Professores da graduação, Colegas de turma, Enfermeiros, obrigada pelos ensinamentos aprendidos, que fazem reflexos na minha trajetória atual.

A Universidade Federal do Paraná, pelo espaço de pesquisa e ensino. Agradeço ao campus de Toledo, onde dediquei muitas horas no laboratório.

A Técnica do laboratório Cinthia, que me auxiliou na pesquisa, foi responsável por nos acompanhar, sempre solicita em todas as dúvidas e questionamentos, muito obrigada.

Ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Professores e Doutores do campus de Palotina obrigada pelo conhecimento transferido nas disciplinas teóricas e práticas.

Ao Laboratório Multiusuário - LABCA do Campus Toledo da Universidade Tecnológica Federal do Paraná pelas análises realizadas.

A CAPES, pelo incentivo financeiro durante os dois anos.

Obrigada, obrigada. Gratidão a todos.

*Mas os que esperam no Senhor renovarão as suas forças e subirão com asas como águias;
correrão e não se cansarão; caminharão e não se fatigarão. Isaías 40:31*

*O que vale na vida não é o ponto de partida, e sim a caminhada. Caminhando e semeando, no
fim terás o que colher. Cora Carolina*

*Agradeço todas as dificuldades que enfrentei; não fosse por elas, eu não teria saído do lugar.
As facilidades nos impedem de caminhar. Mesmo as críticas nos auxiliam muito.
Francisco Cândido Xavier*

RESUMO

A crescente resistência bacteriana aos antimicrobianos e os biofilmes constituem um grande problema de saúde pública que necessita de intervenção, especialmente em pacientes hospitalizados que podem desenvolver infecção relacionada a assistência a saúde, incluindo as de trato urinário associada a utilização de dispositivos médicos. Cateteres favorecem a colonização por células planctônicas e biofilmes, acarretando complicações e elevação da morbimortalidade, bem como custos e tempo de internação. Assim, a bioprospecção e utilização de produtos naturais tem sido alvo de pesquisas na busca de moléculas que tenham alguma atividade biológica, especialmente para conter as questões de resistência e conseguir inibir/erradicar biofilmes. O Brasil apresenta uma biodiversidade muito rica, sendo fonte excelente de compostos naturais que ainda são pouco conhecidos ou inexplorados, principalmente de microrganismos endofíticos. No primeiro capítulo, o objetivo foi realizar uma revisão de literatura sobre a infecções de trato urinário, biofilme em cateteres e perspectivas com fungos endofíticos, metabólitos secundários e compostos bioativos frente a diversos microrganismos. O emprego de fungos endofíticos e compostos bioativos consistem em uma alternativa para minimizar estes tipos de infecções. Os dados presentes na literatura demonstram uma favorável utilização de metabólitos secundários de fungos endofíticos para o controle de diferentes microrganismos. Além disso, podem ser utilizados no controle da formação de biofilmes em dispositivos médicos, como os cateteres vesicais de demora, que são muito susceptíveis a colonização microbiana, sendo responsáveis por infecções graves e persistentes. No segundo capítulo, o objetivo foi avaliar a ação antimicrobiana e antibiofilme *in vitro* de compostos produzidos por fungos endofíticos isolados de flores de *Handroanthus ochraceus*, contra as bactérias patogênicas *Escherichia coli* ATCC 25922 e *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853. Fungos endofíticos foram isolados de flores de *H. ochraceus* coletadas no município de Toledo, Paraná, Brasil. Posteriormente, foram obtidos metabólitos secundários por fermentação submersa e separados nas frações aquosa, em acetato de etila e clorofórmio. Foi avaliada a concentração inibitória mínima e atividade antibiofilme pela técnica de concentração mínima de inibição de formação e de erradicação de biofilme envolvendo cateteres vesicais de látex e silicone. Os fungos foram caracterizados de acordo com gênero e realizada a quantificação de compostos fenólicos e flavonoides dos metabólitos secundários. Os compostos isolados dos fungos endofíticos de *H. ochraceus* apresentaram resultados promissores frente a bactérias gram-negativas *E. coli* e *P. aeruginosa*, onde a quantidade de células bacterianas presentes nos cateteres vesicais foram afetadas, bem como a estruturação da matriz extracelular dos biofilmes. Assim, os compostos dos fungos endofíticos podem ser melhor explorados para o revestimento e impregnação de cateteres urinários.

Palavras-chave: Biofilmes. Compostos fitoquímicos. Endófitos. Infecções urinárias. Produtos biológicos.

ABSTRACT

The growing bacterial resistance to antimicrobials and biofilms constitute a major public health problem that needs intervention, especially in hospitalized patients who may develop healthcare-associated infections, including urinary tract infections associated with the use of medical devices. Catheters favor colonization by planktonic cells and biofilms, causing complications and increased morbidity and mortality, as well as costs and length of hospital stay. Thus, the bioprospecting and use of natural products has been the subject of research in the search for molecules that have some biological activity, especially to contain resistance issues and to be able to inhibit/eradicate biofilms. Brazil has a very rich biodiversity, being an excellent source of natural compounds that are still little known or unexplored, especially endophytic microorganisms. In the first chapter, the objective was to carry out a literature review about urinary tract infections, biofilm in catheters and perspectives with endophilic fungi, secondary metabolites and bioactive compounds against several microorganisms. The use of endophytic fungi and bioactive compounds is an alternative to minimize these types of infections. The data present in the literature demonstrate a favorable use of secondary metabolites of endophytic fungi to control different microorganisms. In addition, they can be used to control the formation of biofilms in medical devices, such as indwelling bladder catheters, which are very susceptible to microbial colonization, being responsible for severe and persistent infections. In the second chapter, the objective was to evaluate the *in vitro* antimicrobial and antibiofilm action of compounds produced by endophytic fungi isolated from flowers of *Handroanthus ochraceus*, against the pathogenic bacteria *Escherichia coli* ATCC 25922 and *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853. Endophytic fungi were isolated from *H. ochraceus* collected in the municipality of Toledo, Paraná, Brazil. Subsequently, secondary metabolites were obtained by submerged fermentation and separated into aqueous fractions, in ethyl acetate and chloroform. The minimum inhibitory concentration and antibiofilm activity were evaluated by the technique of minimum concentration of inhibition of biofilm formation and eradication involving latex and silicone bladder catheters. The fungi were characterized according to gender and the quantification of phenolic compounds and flavonoids of secondary metabolites was performed. The compounds isolated from the endophytic fungi of *H. ochraceus* showed promising results against gram-negative bacteria *E. coli* and *P. aeruginosa*, where the amount of bacterial cells present in the bladder catheters were affected, as well as the structuring of the extracellular matrix of the biofilms. Thus, compounds from endophytic fungi can be better exploited for the coating and impregnation of urinary catheters.

Keywords: Biofilms. Biological products. Endophytes. Phytochemical compounds. Urinary Tract Infections.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	12
1.1	OBJETIVOS.....	14
1.1.1	Objetivo Geral.....	14
1.1.2	Objetivos específicos.....	14
1.2	JUSTIFICATIVA.....	14
	REFERÊNCIAS.....	15
	CAPÍTULO I.....	18
	RESUMO.....	18
1	INTRODUÇÃO.....	18
2	CATETERES VESICAIS E INFECÇÕES ASSOCIADAS.....	19
3	BIOFILMES EM CATETERES URINÁRIOS.....	22
4	PERSPECTIVAS NATURAIS COM FUNGOS ENDOFÍTICOS.....	24
5	METABÓLITOS SECUNDÁRIOS E COMPOSTOS BIOATIVOS.....	27
6	POTENCIALIDADE DE ENDOFÍTICOS E COMPOSTOS.....	30
7	CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS FUTURAS.....	32
	REFERÊNCIAS.....	32
	CAPÍTULO II.....	45
	ABSTRACT.....	45
1	INTRODUÇÃO.....	45
2	MATERIAIS E MÉTODOS.....	47
3	RESULTADOS.....	52
4	DISCUSSÃO.....	56
5	CONCLUSÃO.....	60
	REFERÊNCIAS.....	60
	APÊNDICE CAPÍTULO I	67
	APÊNDICE CAPÍTULO II.....	75

INTRODUÇÃO

O Cateter Vesical de Demora (CVD) é um dispositivo fundamental à saúde nos diferentes níveis de assistência, cuja finalidade é de excretar substâncias presentes na bexiga em situações clínicas que afetam a micção (SÃO PAULO, 2015). Cada instituição estabelece em protocolos, a técnica de inserção, manuseio e cuidados gerais a serem empregados com os dispositivos, incluindo os relacionados a prevenção e controle de infecções (ANVISA, 2017).

Apesar de ser um dispositivo indispensável na assistência, o CVD predispõe ao desenvolvimento da Infecção do Trato Urinário (ITU), caracterizada pela invasão e crescimento de microrganismos nos tecidos que envolvem a uretra até os rins, ocasionando cistite, pielonefrite, bacteriúria e síndrome uretral aguda (BOFF; EICHWALD, 2014).

A colonização microbiana nos cateteres urinários se deve ao fato do dispositivo manter o pertuito continuamente aberto e ocasionar alterações histológicas e fisiológicas que desencadeiam resposta inflamatória local e sistêmica. Além disso, os patógenos também formam biofilmes, que são um conjunto de microrganismos que vivem associados e envoltos por uma matriz polimérica autoproduzida para se protegerem da ação antimicrobiana, de outras condições ambientais adversas e/ou e facilitar a adesão a superfície dos materiais (ANDERSEN; FLORES-MIRELES, 2020).

Dados epidemiológicos enfatizam que a ITU é responsável por mais de 30% de todas as Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde (IRAS), elevando os riscos a cada dia de uso, na qual a infecção se faz presente em 10 a 20% dos pacientes submetidos ao cateterismo (ERCOLE et al., 2013), afetando aproximadamente 150 milhões de pessoas em todo o mundo (FLORES-MIRELES; HREHA; HUSTAND, 2019).

Em razão do tratamento de infecções ser realizado muitas vezes de forma errônea, com antibióticos de amplo espectro que permitem a seleção de bactérias resistentes, bem como de fatores intrínsecos a estes microrganismos, a exemplo das mutações espontâneas, muitos fármacos não exercem a ação terapêutica esperada (DEEPIKA; MURALI; SATYAMOORTHY, 2016; SILVA et al., 2018).

Assim, estratégias promissoras têm sido listadas para solucionar as questões de resistência microbiana e criar condições desfavoráveis para microrganismos e/ou biofilmes, como as modificações na superfície do cateter (ANJUM et al., 2017), inibição da fixação (SINGH et al., 2017) e aplicação de antimicrobianos naturais (MOURA, 2020).

Compostos antimicrobianos atuam causando a morte de microrganismos ou inibindo sua multiplicação, prejudicando a adesão as superfícies dos dispositivos e consequentemente a

formação de biofilme (FRANCOLINI et al., 2017). Desta forma, empregar compostos antimicrobianos nos dispositivos urinários seria uma alternativa viável para combater a colonização bacteriana.

Neste sentido, a natureza tem sido aliada promissora da comunidade humana, pois é fonte de diversos produtos naturais capazes de atuar contra doenças e infecções. Segundo David e colaboradores (2015), 95% da biodiversidade mundial (plantas, animais e microrganismos) ainda não foi estudada, enfatizando que há muito o que se descobrir em relação aos fungos endofíticos, metabólitos secundários e suas atividades biológicas.

Nas últimas décadas, tem se elevado a atenção entre os pesquisadores em estudos sobre endofíticos, aliados às ferramentas de biotecnologia e biologia molecular (NAIR; PADMAVATHY, 2014). Endofíticos consistem em microrganismos que residem no interior dos tecidos vegetais, sendo potenciais produtores de diversos metabólitos bioativos (CHEN et al., 2016; FLORINDO, 2019; LEYLAIE; ZAFARI, 2018).

Entre estes microrganismos estão fungos e bactérias, capazes de sintetizar compostos (metabólitos secundários) com atividades biológicas como: ação antimicrobiana, antitumoral, antioxidante, antiinflamatória, entre outras (ADELEKE; BABALOLA, 2021).

Contudo, segundo Orlandelli et al. (2016) e Rajamanikyam et al. (2017) são poucas as linhagens conhecidas de fungos endofíticos, dispondo da possibilidade de descobrir novas variedades de compostos bioativos, especialmente pela diversidade do ecossistema existente no Brasil e no mundo. Apenas cerca de 1 a 2% de todo o espectro de 300.000 plantas conhecidas foram estudados quanto à sua composição endofítica, sendo algumas nunca examinadas (STROBEL, 2018).

Levando em consideração que não há relatos na literatura a respeito da comunidade de fungos endofíticos associados a espécie *Handroanthus ochraceus*, surgiu o interesse em prospectar e realizar testes antimicrobianos e antibiofilmes com fungos advindos desta planta. O gênero *Handroanthus* pertencente à família Bignoniaceae, popularmente conhecido como ipê, é uma das árvores nativas mais empregadas para arborização urbana no Brasil, principalmente pela florada vistosa e colorida, além de ser reconhecida em algumas espécies, por suas propriedades medicinais (LUCINI; PUTZKE, 2015).

Assim, algumas questões de pesquisa foram listadas:

Fungos endofíticos isolados de *H. ochraceus* são produtores de metabólitos secundários bioativos?

Os metabólitos secundários produzidos pelos fungos endofíticos isolados de *H. ochraceus* são ativos contra *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*?

Os metabólitos secundários produzidos por fungos endofíticos isolados de *H. ochraceus* podem evitar a formação ou erradicar biofilmes em cateteres vesicais?

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo geral

Avaliar a ação antimicrobiana e antibiofilme de metabólitos produzidos por fungos endofíticos isolados da planta *Handroanthus ochraceus*, contra microrganismos causadores de infecções em cateteres vesicais de demora (*Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*).

1.1.2 Objetivos específicos

- Isolar fungos endofíticos associados a flores de *Handroanthus ochraceus*;
- Obter metabólitos secundários dos fungos endofíticos isolados;
- Avaliar a ação antimicrobiana *in vitro* de compostos obtidos de fungos endofíticos isolados de *H. ochraceus* pela técnica de Concentração Inibitória Mínima (CIM) e antibiofilme pela técnica da Concentração Mínima de Inibição da Formação de Biofilme (MBIFC) e Concentração Mínima de Erradicação de Biofilmes (MBEC);
- Visualizar por Microscopia Eletrônica de Varredura a atividade dos compostos naturais testados em cateteres vesicais;
- Determinar a presença de compostos fenólicos e flavonoides no metabólito secundário dos fungos endofíticos;

1.2 JUSTIFICATIVA

Durante muitos anos os antimicrobianos mantiveram em controle inúmeros patógenos, no entanto, com o aumento expressivo das mutações, fatores de virulência e resistência de microrganismos causadores de ITU, a problemática foi se alastrando, tornando-se um grave problema de saúde global.

Tendo em vista que a ITU acomete milhões de pessoas ocasionando complicações, danos a instituição de saúde, custos elevados, com aumento da morbidade e mortalidade, a busca por alternativas eficientes capazes de erradicar microrganismos multirresistentes e biofilmes é de grande relevância. Somado a isso, no Brasil, inúmeras plantas, substâncias naturais, fungos endofíticos e compostos metabólitos ainda são inexplorados.

A colonização de dispositivos invasivos é um desafio promissor para a comunidade científica, instigando a busca de novos antimicrobianos e revestimentos para cateter. Neste seguimento, é inegável a necessidade e relevância da bioprospecção de compostos de fungos endofíticos com atividade antimicrobiana e antibiofilme para minimizar as infecções de trato urinário e originar descobertas biotecnológicas.

REFERÊNCIAS

ADELEKE, B. S.; BABALOLA, O. O. Pharmacological Potential of Fungal Endophytes Associated with Medicinal Plants: A Review. **J. Fungi**, v. 7, n. 147, 2021.

ANDERSEN, M. J.; FLORES-MIRELES, A. L. Urinary Catheter Coating Modifications: The Race against Catheter-Associated Infections. **Coatings**, v. 10, n. 23, 2020.

ANJUM, S. et al. Biomodification Strategies for the Development of Antimicrobial Urinary Catheters: Overview and Advances. **Glob Chall**, v. 2, n. 1, 1700068, 2017.

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

BOFF, E.; EICHWALD, T. Perfil microbiológico de cateteres urinários retirados de pacientes internados nos hospitais casa Vitta (São Miguel do Oeste, SC) e São José (Maravilha, SC). **Seminário de Iniciação Científica, Seminário Integrado de Ensino, Pesquisa e Extensão e Mostra Universitária**. São Miguel do Oeste, 2014.

CHEN, L. et al. Endophytic fungi with antitumor activities: Their occurrence and anticancer compounds. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 42, n. 3, p. 454-473, 2016.

DAVID, B.; WOLFENDER, J.-L.; DIAS, D. A. The pharmaceutical industry and natural products: historical status and new trends. **Phytochemistry Reviews**, v. 14, n. 2, p. 299–315, 2015.

DEEPIKA, V. B.; MURALI, T. S.; SATYAMOORTHY, K. Modulation of genetic clusters for synthesis of bioactive molecules in fungal endophytes: A review. **Microbiological Research**, v. 182, p. 125-140, 2016.

ERCOLE, F. F. et al. Revisão integrativa: evidências na prática do cateterismo urinário intermitente/demora. **Rev. Latino-Am. Enfermagem**, Ribeirão Preto, v. 21, n. 1, p. 459-468, fev. 2013.

FLORES-MIRELES, A. L.; HREHA, T. N.; HUNSTAND, D. A. Pathophysiology, Treatment, and Prevention of Catheter-Associated Urinary Tract Infection. **Top Spinal Cord Inj Rehabil**, v. 25, n. 3, p. 228–240, 2019.

FLORINDO, R. H. S. **Bioprospecção de metabólitos secundários bioativos produzidos por fungos endofíticos associados à Piper sp. coletada no Parque Estadual do Rio Doce, Minas Gerais**. 109f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Ouro Preto. Instituto de Ciências Exatas e Biológicas. 2019.

FRANCOLINI, I. et al. Antifouling and antimicrobial biomaterials: an overview. **Journal of pathology, microbiology and immunology**, v. 125, n. 4 special, p. 392-417, 2017.

LUCINI, F.; PUTZKE, J. Fungos fitopatogênicos em *Handroanthus chrysotrichus* (ipê amarelo – *bignoniaceae*) cultivadas nos municípios de Santa Cruz do Sul e Venâncio Aires – RS. **Caderno de Pesquisa, série Biologia**, v. 27, n. 1, p. 49-55, 2015.

LEYLAIE, S.; ZAFARI, D. Antiproliferative and Antimicrobial Activities of Secondary Metabolites and Phylogenetic Study of Endophytic *Trichoderma* Species From *Vinca* Plants. **Frente. Microbiol.**, 2018.

MOURA, S. S. T. **Avaliação da atividade antimicrobiana de fungos endofíticos isolados de plantas no brasil contra patógenos humanos**. 88p. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal de Santa Catarina. Centro de ciências biológicas. Programa de pós graduação em biotecnologia e biociências. Florianópolis-SC, 2020.

NAIR, D. N.; PADMAVATHY, S. Impact of endophytic microorganisms on plants, environment and humans. **The Scientific World Journal**, v. 2014, p. 1-11, 2014.

ORLANDELLI, R. C. et al. Screening of endophytic sources of exopolysaccharides: Preliminary Characterization of crude exopolysaccharide produced by submerged culture Of *Diaporthe* sp. JF766998 under different cultivation time. **Biochimie Open**, v.2, 33e4, 2016.

RAJAMANIKYAM, M. et al. Endophytic Fungi as Novel Resources of natural Therapeutics. **Braz. arch. biol. technol.**, v. 60, 2017.

SÃO PAULO. Prefeitura Municipal de Campinas. **Protocolo de Assistência de Enfermagem**. Serviço de atendimento domiciliar de Campinas. Campinas-SP, 2015. Disponível em: <http://www.campinas.sp.gov.br/sa/impressos/adm/FO1236.pdf> Acesso em: 08 mar. 2020

SILVA, L. R. et al. Bioativos antimicrobianos produzidos por fungos endofíticos associados a plantas do semiárido. **Ciência Agrícola**, v. 16, número suplementar, p. 5-7, 2018.

SINGH, S. et al. Understanding the mechanism of bacterial biofilms resistance to antimicrobial agents. **Open Microbiol J.**, v. 11, p. 53–62, 2017.

STROBEL, G. The Emergence of Endophytic Microbes and Their Biological Promise. **J. Fungi**, v. 4, n. 2, p. 57, 2018.

CAPÍTULO I

Artigo a ser submetido a revista Letters in Applied Microbiology

ESTRATÉGIA DE CONTROLE DE INFECÇÃO ASSOCIADA A CATETER URINÁRIO UTILIZANDO BIOCOMPOSTOS FÚNGICOS

Emilli Karine Marcomini¹, Juliana Bernardi-Wenzel¹

¹Programa de Pós-graduação em Biotecnologia – Universidade Federal do Paraná – Setor Palotina.

RESUMO

As infecções de trato urinário associadas a cateter continuam sendo preocupantes, visto o crescimento de dados epidemiológicos, custos, resistência bacteriana e complicações associadas a morbidade. A bioprospecção de plantas como estratégia para controle de microrganismos patogênicos tem ganhado espaço na literatura, em decorrência da larga diversidade existente na flora brasileira, que permite a exploração de fungos endofíticos e diversos compostos, a serem empregados em células planctônicas ou para inibir a fixação das células e impedir a formação de biofilmes. A presente revisão de literatura aborda o processo de infecção em cateter urinário, biofilmes associados e a perspectiva de fungos endofíticos e compostos bioativos frente a diversos microrganismos. Os dados presentes demonstram uma favorável utilização de fungos endofíticos no controle de microrganismos gram-positivos e gram-negativos. Os metabólitos extraídos dos fungos endofíticos com ação antibacteriana podem ser categorizados especialmente entre os da classe dos compostos fenólicos. Além disso, podem ser utilizados no controle da formação de biofilmes em dispositivos médicos, como os cateteres vesicais de demora, que são muito suscetíveis a colonização microbiana, sendo responsáveis por infecções graves e persistentes.

PALAVRAS-CHAVE: biofilmes, bioprospecção, endófitos, infecções urinárias, ação antimicrobiana, resistência à antibióticos.

1 INTRODUÇÃO

A Infecção de Trato Urinário Associada a Cateter (ITU-AC) é uma das infecções nosocomiais mais frequentes na prática clínica, envolvendo dispositivos médicos. Dados epidemiológicos revelam que a ITU corresponde a 45% destas infecções, com incidência de 3,1-7,4/1.000 cateteres/dia (Anvisa 2017). De acordo com estudo de Vallejo-Torres et al. (2018), o custo médio de internação por paciente fica em 5.700 euros nas ITU complicadas.

Um dos fatores associados a ITU complicada é a resistência bacteriana (Vaz et al. 2018a). Patologias advindas da resistência acarretam cerca de 700.000 mortes por ano em todo

o mundo, sendo que aproximadamente 2,4 milhões de pessoas poderão ir a óbito entre 2015 e 2050, mesmo nos países de elevados mais desenvolvidos, caso não haja esforços sustentados para conter a problemática da resistência microbiana (Who 2019).

Entre os mecanismos que geram resistência microbiana estão as mutações e recombinações gênicas, que favorecem o desenvolvimento de fatores ambientais de adaptação, como a formação dos biofilmes. Biofilmes consistem em uma matriz de exopolissacarídeos (EPS), proteínas e microrganismos que fixam-se em superfícies, como os cateteres (Rabin et al. 2015).

As infecções de biofilmes associadas a dispositivos médicos compreendem um tema atual de pesquisa, visto que são a razão predominante de infecções persistentes (Mulla, Kumar & Rajdev 2016), sendo o impacto financeiro por danos causados pelos biofilmes estimado em bilhões de dólares a cada ano (Cattó, Villa & Cappitelli 2018).

Erradicar biofilmes é indiscutivelmente mais trabalhoso do que eliminar as células na forma planctônica (González-Vera & Shukla 2020; Jenks et al. 2020), especialmente quando aderidos a dispositivos (Mitchell, Zarnowski & Andes 2016), uma vez que se tornam cerca de 5 a 4000 vezes menos susceptíveis a ação de um antimicrobiano (Sasani et al. 2021).

Assim, a utilização de compostos antimicrobianos em dispositivos urinários se faz promissora, especialmente dentre aqueles que são capazes de atender as características indispensáveis, como a resistência à tração, maciez, flexibilidade, biocompatibilidade e que atenda aos requisitos de fluxo urinário (Singha, Locklin & Handa 2017).

Diante do exposto, o objetivo deste trabalho foi realizar uma revisão de literatura sobre as infecções urinárias, formação de biofilmes em cateteres vesicais e perspectivas com fungos endofíticos, metabólitos secundários e compostos bioativos frente a microrganismos patogênicos.

2 CATETERES VESICAIS E INFECÇÕES ASSOCIADAS

O sistema urinário possui a finalidade de excretar resíduos produzidos pelo organismo, garantindo a homeostasia por meio das regulações de concentração de substâncias (Tortora & Derrickson 2017). A micção, isto é, a liberação da urina, é um reflexo voluntário do sistema nervoso autônomo, provocado pela contração do músculo vesical (sistema nervoso parassimpático) e o relaxamento do esfíncter uretral (sistema nervoso simpático) (Guyton & Hall 2017).

Todavia, existem condições clínicas como micção espontânea prejudicada, necessidade de monitorização de débito urinário, casos clínicos de tratamento intensivo, pós-operatório e enfermidades crônicas em que se faz necessário a utilização de um dispositivo invasivo que realize a função de eliminação da urina (Anvisa 2017).

Cateter Urinário ou Cateter Vesical de Demora (CVD), é um dispositivo invasivo em forma de tubo fabricado de material látex, poliuretano ou silicone, inserido pelo orifício da uretra estendendo-se até a bexiga. A presença do cateter origina danos no sistema urinário, resultando em uma resposta inflamatória, que potencialmente pode se tornar infecciosa (Walker et al. 2017).

Embora beneficiem o paciente no sentido de realizar parte da função do sistema urinário, por outro lado, a presença do dispositivo médico ocasiona infecções que podem ser fatais, uma vez que causa estresse mecânico, alterações histológicas, imunológicas, edema, esfoliação, irritação epitelial e lesão (Francolini et al. 2017; Andersen & Flores-Mireles 2020).

A permanência de microrganismos patogênicos no trato urinário deriva inúmeras complicações e patologias que podem limitar-se à bexiga, denominada cistite, estender-se até os rins ocasionando a pielonefrite ou podem ainda projetar a outros sistemas (sepse) e tornar-se mais persistentes (Levinson 2011).

O uso de dispositivos médicos, como cateteres urinários estão associados a ITU-AC (Anjos, Azevedo & Peeling 2020), frequentemente ligados ao gênero feminino, pelas características anatômicas que facilitam a ascensão de microrganismos e a colonização da vagina por membros da microbiota fecal (Conover et al. 2019; Malinovski & Estorillo 2021), sendo a duração do cateterismo um fator de risco determinativo para infecção (Kranz 2020; Batista et al. 2018).

A duração do uso do cateter difere de acordo com condições clínicas, podendo ser de 14 dias ou menos (cateterismo de curto prazo), ou estender por cerca de 30 dias ou mais (cateterismo a longo prazo) (Geng et al. 2012). Em um estudo documental realizado em Minas Gérias, observou-se maior prevalência de ITU-AC em pacientes cujo tempo de internação foi igual ou superior a 15 dias e o uso do CVD foi igual ou superior a 10 dias, sendo o desfecho a óbito em 11,7% (Barbosa, Mota & Oliveira 2019).

Belfield e colaboradores (2019) relatam que as ITU-AC tem efeitos na qualidade de vida, saúde mental e custos financeiros, sendo a origem mais comum dentre as infecções nosocomiais (Hosseini & Ghaemi 2018).

É considerável salientar que a escolha do material do cateter urinário influencia na potencialidade da infecção. Dentre os disponíveis no mercado estão os de látex, poliuretano e

silicone. Os cateteres de látex apresentam alta propensão à formação de biofilmes, devido à composição favorável de superfícies irregulares hidrofóbicas e hidrofílicas que permitem a fixação e colonização por vários microrganismos (Stickler 2014).

Os cateteres de poliuretano são apontados como mais biocompatíveis, em razão de suas propriedades, como a tenacidade, que asseguram maior resistência e durabilidade (Verma et al. 2016). Lee e colaboradores (2017) concluíram que os materiais do cateter a base de silicone são lisos e podem reduzir a formação de biofilme microbiano, especialmente os de silicone revestido de liga prateada, representando um dos nanomateriais mais estudados em aplicações biomédicas (Anjum, Abbasi & Shinwari 2016).

O silicone é um polímero que contém o elemento químico sílica junto com hidrogênio, oxigênio e carbono, presente em vários dispositivos médicos, incluindo cateteres urinários, acessos vasculares de longa duração e equipamentos para nutrição parenteral (Marino 2015).

Uropatógenos formadores de biofilme foram mais vistos em pacientes com cateter de látex revestido de silicone em comparação ao cateter de silicone puro, sendo a diferença significativa entre eles (Kumar & Bose 2020). Corroborando, Lawrence e Turner (2005) afirmam que o material de silicone é o preferível para a uretra devido à sua resistência mecânica, elasticidade, maior rigidez e parede relativamente fina, que reduz a incrustação e bloqueio. Embora destaquem que isso não confere superioridade quando se trata de retardar o aparecimento de infecção e encrustação, além disso, afirmam que a natureza mais rígida do cateter pode comprometer o conforto do paciente.

Todavia, o cateter Foley, introduzido em meados da década de 1930, composto de água, teor de borracha seca, carboidratos, proteínas, lipídeos, açúcares e outros (Zhang 1999; Synaflex 2000), ainda é o dispositivo mais usado, pois é facilmente processado e moldado, minimizando custos de produção, aliado as características físicas de boa resistência e forças relativamente altas de tração (Wiley 2004).

De modo geral, não foi desenvolvido um material que ofereça inibição total de crescimento de bactérias e fungos, no entanto, estratégias têm sido levantadas para modificar a superfície e o interior do cateter, de modo a reduzir infecções relacionadas a esses dispositivos e a assistência à saúde (Anjum et al. 2017). Existem aquelas que revestem apenas externamente (primeira geração) ou aquelas que revestem externamente e internamente (segunda geração) (Abad & Sufdar 2011).

Dentre os microrganismos causadores de ITU-AC destacam-se as bactérias *Escherichia coli*, *Enterococcus* sp., *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa* e a levedura *Candida*

albicans (Stickler 2014). Salzani e colaboradores (2019) destacaram *E. coli*, *Klebsiella* spp., *Enterobacter* spp., *Staphylococcus* spp. e *Proteus* spp.

Amostras de urina são fonte destaque de *Klebsiella pneumoniae*, especialmente no estado do Paraná, em que houve aumento expressivo de isolados entre 2009 e 2015 (Marçal et al. 2021), sendo alvo de emergência em razão da resistência aos carbapenêmicos (KPC) (Bedenic et al. 2021 Gioppo, Zancanaro & Bellaver 2019).

Destacam-se como “agentes patogênicos prioritários” resistentes aos antibióticos bactérias da família Enterobacteriaceae incluindo *K. pneumoniae* e *E. coli*, (Montenegro-Diaz et al. 2016; Hasan et al. 2020; Livermore 2012; Soares 2019), *P. aeruginosa* (Musafer et al. 2014) e bactérias do gênero *Enterococcus* (Fristich, Rice & Arias 2014; Kart et al. 2017; Gaston et al. 2020).

O uropatógeno *E. coli* apresenta inúmeros fatores de virulência para colonização no trato urinário, as quais incluem adesinas fimbriais (F1C fimbriae S, P e tipo 1), adesinas afimbrial, toxinas (fator necrotizante hemotróxico e citotóxico), siderósfors (sistema de aerobactina) e polissacarídeo capsular (cápsulas do grupo II) (Sharma et al. 2016).

Outra espécie bacteriana de relevância na ITU é *P. aeruginosa*, que também secreta compostos siderósfors para sobreviverem a ambientes limitados por ferro (Newman, Floyd & Fothergill 2017). A capacidade da *P. aeruginosa* causar infecções encontra-se na grande variedade de fatores de patogenicidade, tanto associados a célula bacteriana, como a flagelo, *pili* (tipo IV), proteínas de membrana e secretado, quanto a fatores associados a formação de biofilme, efetores do sistema de secretação tipo 2, 3 ou 5, pigmentos e efetores de detecção de quorum, contendo alta capacidade de se adaptar a condições adversas, como pH e osmolaridade da urina (Zarza et al. 2019).

3 BIOFILMES EM CATETERES URINÁRIOS

De acordo com Singh e colaboradores (2017) biofilmes compreendem uma comunidade de microrganismos que se aglomeram, fixam em superfícies, associado a uma matriz de exopolissacarídeos (EPS). Constituem um mecanismo de defesa das bactérias, no qual o crescimento depende de muitos fatores bióticos e abióticos (Tasneem et al. 2018).

O processo de formação de biofilmes se inicia com a adesão de bactérias planctônicas, a qual se aproximam da superfície pelo movimento *browniano* ou por meio de flagelos. Quando o microrganismo e a superfície atingem um ponto crítico de proximidade (na faixa de ≈ 1 nm), sua adesão depende das forças atrativas e repulsivas, onde ocorre interações físico-químicas, e

em condições favoráveis, a proliferação bacteriana aumenta e se inicia a produção da matriz de exopolissacarídeo (Vaz et al. 2018b).

Os EPS são polímeros de alto peso molecular compostos de resíduos de açúcar, servindo como suporte para a adesão de outros carboidratos, proteínas, ácidos nucleicos e lipídios. Ao serem avistados em microscopia eletrônica apresentam-se com longas fitas que são fixadas nas superfícies das células e estendidas para formação de grandes redes, os biofilmes (Rabin et al. 2015).

Embora a formação de biofilme tenha sido observada em 1708, quando Antonie Van Leeuwenhoek investigou o tecido colonizado por micróbios com seu novo microscópio, a pesquisa sobre a constituição do biofilme só começou a fazer avanços significativos e exponenciais nos últimos 15-20 anos (Winter, Lemos & Mireles 2019). O ciclo da formação de biofilme ocorre em sete estágios, conforme ilustrado na Figura 1.

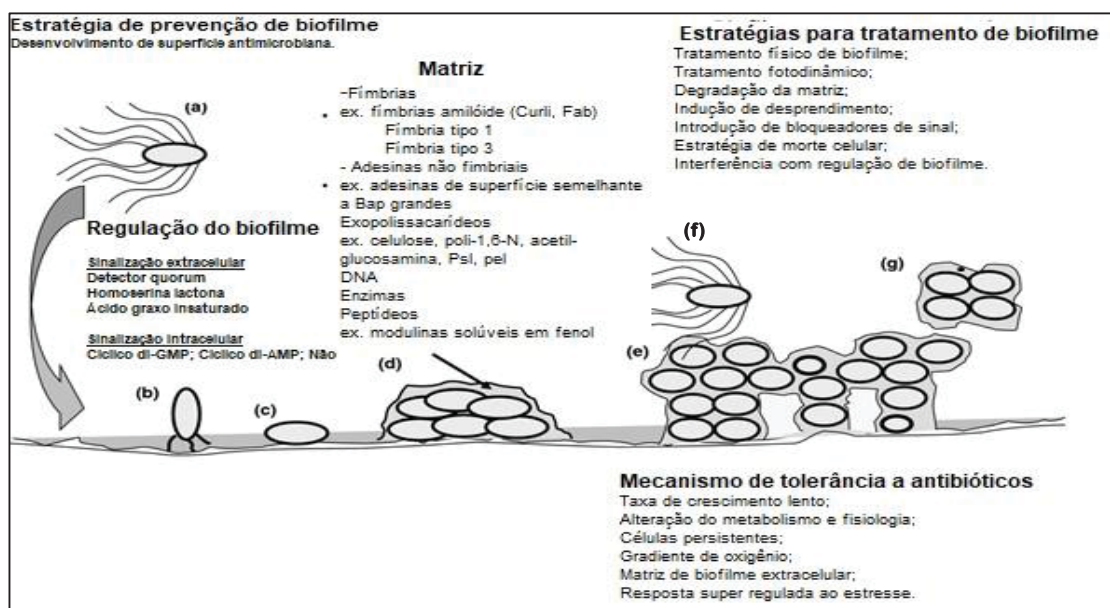


FIGURA 1: Constituição, processo de formação, estratégias de prevenção e para tratamento de biofilmes. Em (a): célula de nado livre; (b): fixação reversível à superfície; (c) fixação irreversível à superfície; (d) formação de microcolônias através da divisão celular e produção de matriz extracelular; (e) formação de uma arquitetura de biofilme tridimensional madura; (f) as células podem se desintegrar ativamente do biofilme; (g) as células podem ser eliminadas passivamente por meio de interrupção mecânica.

Fonte Adaptado de Romling e Balsalobre (2012).

A formação de biofilmes também está associada a expressão de genes de virulência (Gunardi et al. 2021) e expressão de proteínas (Romling & Balsalobre 2012; Romling et al. 2014), como citobromo bd, essencial para homeostasia de uropatógenos (Beebout 2017). Em razão da bexiga ser um órgão com limitação de ferro, patógenos utilizam de sideróforos, para

captação de ferro (Flores-Mireles, Hreha & Hunstand 2019), empregando métodos para conter a resposta do sistema imunológico do hospedeiro (Green & Mecsas 2016).

Dessa forma, os tratamentos antibiofilme devem contemplar as interações patógeno-hospedeiro, microbiota local e estratégias para conter a diversidade de infecções, no entanto, há complexidade de erradicação de biofilmes (Silva, Afonina & Akline 2021; Trindade et al. 2020). A incrustação e colonização de cateteres mantêm-se independentemente da criação de novos revestimentos e medicamentos (Machul et al. 2018), o que se torna desafiador ao campo científico.

A superfície do cateter urinário pode ser colonizada por microrganismos (Tarabal et al. 2021) e se tornar um ponto de partida para a formação de biofilmes (Sampaio 2018), que consequentemente após instalados, criam barreiras para os antibacterianos, camuflando-se (Gayani 2021) e exigindo maiores quantidades de antibióticos para seu combate (Mulla, Kumar & Rajdev 2016).

A adesão a superfície do cateter é um dos pontos mais importantes e fundamentais para a formação do biofilme, sendo influenciada pelas propriedades dos materiais, a morfologia da superfície do cateter, as interações polares, hidrofobicidade e hidrofiliabilidade (Cattó, Villa & Cappitelli 2018).

A resistência aos antimicrobianos e a formação de biofilmes dificultam estratégias de controle de infecção (Moura 2020; Ramírez-Castillo et al. 2018; Tiago et al. 2020), tornando-se um desafio para a saúde global (Scott et al. 2019; Who 2019). A tríade fatores de virulência, formação de biofilme e interação hospedeiro-patógeno interferem na prevenção e controle de infecção (Vipin et al. 2019). Mas é notável que modificações simples nas características hidrodinâmicas do cateter podem ter um impacto significativo na colonização bacteriana (Ionescu 2021).

4 PERSPECTIVAS NATURAIS COM FUNGOS ENDOFÍTICOS

O Brasil engloba seis biomas de características distintas, cada qual abrigando sua fauna e flora específica. A Mata Atlântica, ocupa mais de 1,3 milhões de km² em 17 estados do território brasileiro, onde estima-se que existam cerca de 20 mil espécies vegetais, incluindo as endêmicas e ameaçadas de extinção (Brasil 2021; Eforzza et al. 2010).

A diversidade de um bioma com características únicas, favorece a descoberta de novos compostos bioativos e a busca por inovações de produtos, capazes de controlar muitas doenças e enfermidades, bem como resolver problemas terapêuticos (Florindo 2019).

Apesar do interesse recente, o uso de produtos naturais por meio de plantas medicinais é longínquo, datando desde 2.400 a.C (David et al. 2015), ou ainda quando patologias eram tratadas com ervas a partir de conhecimentos tradicionais ligados a natureza (Lócio 2019). Somado a isso, as questões de resistência de microrganismos a longo prazo, aumento do consumo de antibióticos e limitação das possibilidades terapêuticas, exige a prospecção de compostos bioativos naturais (Boecke et al. 2014; Chen et al. 2016; Adeleke & Babalola 2021).

Assim, a biodiversidade pode ser explorada para descoberta de novos compostos, produtos, fármacos e fitoterápicos. Os antimicrobianos naturais são extraídos e produzidos a partir de fontes da natureza, sendo mais seguros, podendo até serem substitutos dos fármacos sintéticos (Anjum et al. 2017) e posteriormente otimizados para aumentar a produção e a inibição de crescimento bacteriano (Moreno et al. 2018; Sousa et al. 2019).

A bioprospecção biotecnológica é uma estratégia de utilização da biodiversidade, no qual, os produtos encontrados podem ser replicados, sintetizados ou produzidos em laboratórios de forma mais sustentável (Figura 2) (Astolfi Filho, Silva & Bigi 2014; Saccaro & Nilo 2011; Brasil 2015).

A prospecção consiste na busca por organismos, genes, enzimas e compostos que possam ter atividades biológicas e potenciais para desenvolvimento de produtos (Wani et al. 2015; Freitas et al. 2020). Dentre esses, destaca-se os endofíticos, termo introduzido pela primeira vez em 1866 por Bary, que refere-se a organismos encontrados nos tecidos vegetais (Hughes 2016), habitando espaços intracelulares, sem causar danos a planta hospedeira (Nair & Padmavathy 2014; Wani et al. 2015; Pamphile et al. 2017).

Endofíticos entram nas plantas através de aberturas naturais, como hidátodos, estômatos e lenticelas, feridas causadas por abrasão com partículas de solo, formação de raízes laterais e microporos (Lata et al. 2018), variando de acordo com fase (idade) das plantas, tipo de tecido e condições ambientais (Jia et al. 2016).

Nair e Padmavathy (2014), Schulz et al. (2015), Wani et al. (2015) e Pamphile et al. (2017), listam as inúmeras funcionalidades dos endofíticos: auxiliam no crescimento e desenvolvimento da planta, com a fitoestimulação, a absorção de elementos essenciais como carbono, oxigênio, hidrogênio, nitrogênio; produzem diversos hormônios de crescimento; protegem a planta hospedeira das condições ambientais desfavoráveis (estresse abiótico e biótico); produzem pigmentos para aplicabilidade industrial; secretam enzimas, como as pectinases, celulasas, xilanases e proteases; produzem e secretam metabólitos secundários e são fonte de compostos bioativos, com atividades biológicas distintas.

Fungos endofíticos são considerados promissores para novas descobertas biotecnológicas, pois constituem fonte de metabólitos potenciais e ativos, sendo inspecionados em busca de biomoléculas com atividade antibacteriana (Rajamanikyam et al. 2017; Moura 2020), devido às questões de resistência microbiana que tem causado preocupações em escala global (Schulz et al. 2015).

A possibilidade de serem grandes produtores de substâncias bioativas os classifica em organismos de interesse, aliados as vantagens de baixo custo de produção e a facilidade de manipulação (Specian et al. 2014). A importância farmacológica destes fungos é promissora para prospecção de compostos bioativos nas áreas agrícola, farmacêutica e medicinal, sendo capazes de produzir substâncias antimicrobianas e outros produtos de interesse biotecnológico (Hughes 2016; Adeleke & Babalola 2021).

Para Strobel (2018) gêneros fúngicos frequentemente isolados incluem *Fusarium* sp., *Colletotrichum* sp., *Phoma* sp., *Pestalotiopsis* sp., *Xylaria* sp., *Curvularia* sp. e *Cladosporium* sp.

Hardoim e colaboradores (2015) realizaram um levantamento de fungos endofíticos e seus respectivos filos em um banco de dados contendo 8.439 sequências eucarióticas recuperadas do Centro Nacional de Informações de Biotecnologia (NCBI), a partir de agosto de 2014, no qual foram listados dentre os pertencentes a classe do *Glomeromycota* (40%), *Ascomycota* (31%), *Basidiomycota* (20%), filos não identificados (8%) e, em menor extensão, *Zygomycota* (0,1%).

Endófitos microbianos estão presentes em todas as espécies de plantas conhecidas, mas ainda é inexplicável como muitos produzem metabólitos do hospedeiro, além disso não há um banco de dados para microrganismos endofíticos e seus metabólitos, o que traz dificuldades maiores de caracterização (Khare, Mishra & Arora, 2018). Desta forma, há uma grande necessidade em estudar fungos endofíticos, catalogar sua prospecção e registrar patentes, pois no Brasil, as pesquisas desta temática são pequenas comparadas a biodiversidade existente ainda inexplorada (Oliveira et al. 2021).

Para compreender esta dimensão, Gonçalves, Bastos e Hanna (2017) mapearam as patentes do *European Patent Office* (EPO), Instituto Nacional da Propriedade Industrial (INPI) do Brasil e *World Intellectual Property Organization* (WIPO), a fim de verificar a frequência de depósitos sobre o uso de fungos endofíticos e suas aplicações na indústria farmacêutica. Das 36 patentes registradas entre 2003 e 2015, apenas cinco listadas no INPI eram relacionadas a fungos endofíticos e aplicações farmacêuticas. A China em geral foi verificada como maior depositante de patentes sobre fungos endofíticos, sendo uma das potências em biotecnologia.

Em relação ao ranking de patentes lideram os Estados Unidos da América, Japão e China, sendo o Brasil, ocupante dos últimos lugares.

5 METABÓLITOS SECUNDÁRIOS E COMPOSTOS BIOATIVOS

Os metabólitos secundários são definidos por moléculas pequenas e orgânicas, produzidas por fungos endofíticos em conjunto com enzimas (Scharf et al. 2014), a depender de condições ambientais de inserção (Card et al. 2015). Fundamentais nas interações metabólicas entre o fungo e a planta hospedeira, estão associados ao processo de sinalização, regulação e defesa (Bhardwaj & Agrawal 2014).

Uma referência pertinente na utilização de metabólitos fúngicos foi a descoberta da penicilina, substância sintetizada pelo fungo *Penicillium chrysogenum*, descrita em 1928 por Alexander Fleming (Pereira & Pita 2005).

Existem vários métodos de obtenção de extratos de metabólitos secundários a partir de endofíticos, incluindo a maceração, percolação, infusão, decocção e extração aquoso-alcoólica por fermentação (Pandey & Tripathi 2014). Para a concentração dos extratos é fundamental que sejam realizados processos de secagem, como o spray-dryer, liofilização ou evaporação (Rodrigues et al. 2016).

Em se tratando do solvente para extração, este deve ser o mais seletivo possível e por meio de sua polaridade se extrairá substâncias desejadas. Na Tabela 01 estão apresentados exemplos de solventes de extração e os principais compostos obtidos em cada.

TABELA 1: Solventes utilizado na extração de compostos ativos.

ÁGUA	ETANOL	METANOL	CLOROFÓRMIO	ÉTER	ACETONA	ACETATO DE ETILA
Antocianinas	Taninos	Antocianinas	Terpenos	Alcaloides	Fenólicos	Flanovoides
Taninos	Polifenóis	Terpenoides	Flanovoides	Terpenos	Flavonois	Cumarinas
Saponinos	Poliacetilenos	Saponinas		Cumarinas		
Terpenoides	Flavonóis	Taninos		Ácido graxo		
Polipectídeos	Esteróis	Lactonas				
Lectinas	Alcaloides	Flavones				
		Polifenóis				

Fonte Adaptado de Choze (2004) e Pandey e Tripathi (2014).

É relevante elucidar que as plantas produzem dois diferentes metabólitos, os primários (função estrutural, crescimento e desenvolvimento) e os secundários divididos em três grupos distintos quimicamente, apresentados a seguir.

Os terpenos apresentam uma grande diversidade estrutural, com mais de 35 mil substâncias identificadas. Eles são derivados teóricos do isopentenilpirofosfato, uma estrutura de cinco carbonos atingindo até 40 carbonos. Ainda que apresentem diferenças estruturais entre si, todos os terpenos são essencialmente estruturados em blocos de cinco carbonos (Felipe & Bicas 2017).

Os alcaloides são agrupados por terem um caráter alcalino, conferido pela presença substâncias orgânicas ricas em nitrogênio, dentro de um ou mais anéis heterocíclicos. Estima-se que dos 27 mil alcaloides conhecidos no momento, 21 mil são de origem vegetal. Dentro deste grupo estão compostos químicos como a nicotina e a cafeína (Reyes-Silva, Salazar-Campos & Ríos-Cortes 2020).

Os compostos fenólicos fazem parte de um dos grupos mais abundantes, são caracterizados pela presença da hidroxila funcional ligada a um anel aromático e biossintetizados em plantas pela via do ácido chiquímico e a do acetato-malonato. Destacam-se pela importância aplicativa, variedade na estrutura química e atividade biológica de polifenóis, com relatos de atividades antioxidantes, antimicrobianas, anticancerígenas, entre outras (Martin 2018).

Os tipos de compostos pertencentes a cada grupo estão representados na Figura 3.

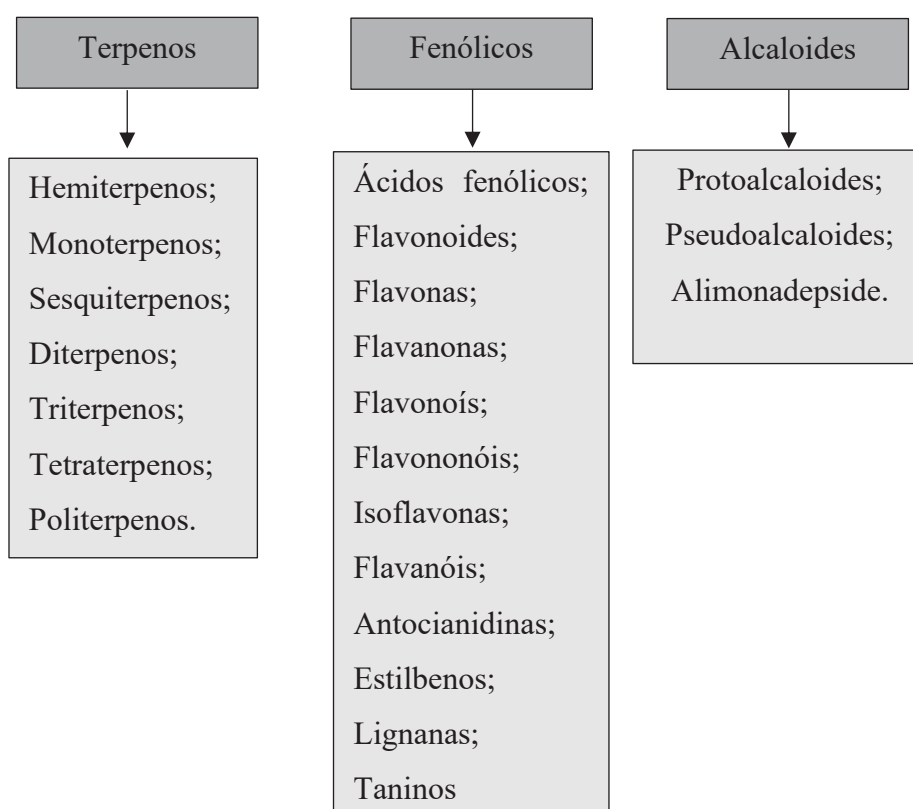


FIGURA 3: Principais categorias de compostos obtidos do metabolismo secundário de fungos endofíticos.

Fonte Vizzotto, Krolow e Weber (2010).

Os flavonoides são os mais representativos do grupo, possuem como estrutura básica dois anéis benzênicos conectados através de uma pirona, derivados de aminoácidos aromático. Baseiam-se em sua maioria por uma estrutura fundamental que possui um esqueleto formado por de 15 átomos de carbono constituído por dois anéis de benzeno, ligado por meio de uma cadeia três carbonos entre elas e um oxigênio como heteroátomo (Santos & Rodrigues 2017).

Seus subgrupos variam de acordo com o padrão de hidroxilação, glicosilação, esterificação e amidação, capazes de modular a polaridade, toxicidade e direcionamento intracelular destes compostos (Huber & Rodriguez-Amaya 2008; Arnoso, Costa & Schmidt 2019).

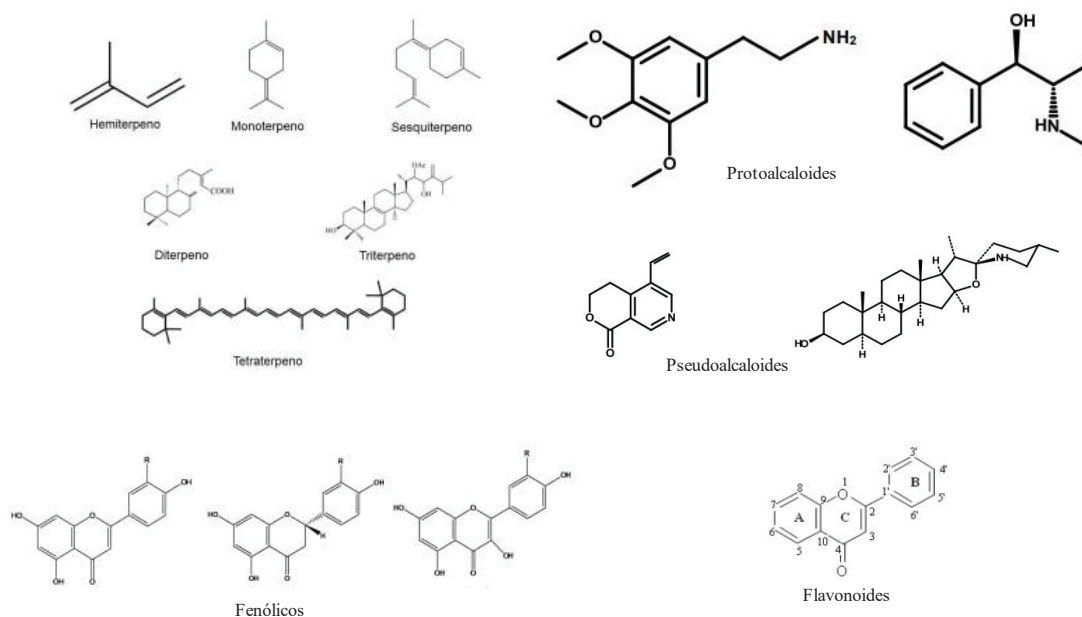


FIGURA 4: Estrutura básica de algumas classes de metabólitos secundários: terpenos, alcaloides, fenólicos e flavonoides.

Fonte Costa (2009), Moderno (2009) Moreira (2013), Souza (2014).

Os fungos endofíticos produzem compostos metabólicos como pestacina, taxol, camptotecina, ergoflavina, podofilotoxina, benzopirano, isopestacina, floroglucinol,

tetrahidroxi-1-metilxantona, salidro, borneol, dibenzofurano, metil penifenona, lipopeptídeo e penifenona (Adeleke & Babalola 2021). Specian e colaboradores (2014) citam principalmente os alcalóides, esteróides, terpenóides, isocumarinas, quinonas, fenilpropanóides, ligninas, fenóis e ácidos fenólicos, metabólitos alifáticos, lactonas, citocatalasinas, flavonoides, peptídeos e xantonas.

6 POTENCIALIDADE DE ENDOFÍTICOS E COMPOSTOS

O seguimento da impregnação de cateteres utilizando produtos naturais tem sido promissor, associado a funcionalização direta da superfície com moléculas antimicrobianas, uso de nanopartículas, capazes de penetrar melhor na densa matriz de biofilmes (González-Vera & Shukla 2020) e estratégias anti-incrustantes visando à prevenção da adesão bacteriana e colonização da superfícies dos cateteres (Faustino, Lemos, Monge & Ribeiro 2020).

Materiais em nanoescala fornecem meios ideais para reter as atividades antimicrobianas de metabólitos secundários (Al-Jumaili, Kumar, Bazaka & Jacob 2018; Rahman et al. 2019), podendo ser utilizados para revestimentos pela excelente interação com membranas celulares de bactérias e fungos (Karimi et al. 2018).

Dispositivos médicos podem ser impregnados na prevenção e inativação de biofilme com antimicrobianos como a Clorexidina, prata (Bayramov & AnnNeff 2017), polímeros de quitosana, de forma isolada ou associada a filmes incrementados de extratos vegetais (Ramos, Santos, Rodriguez & Macedo 2018) e/ou com fitoquímicos (Kot, Wicha, Piechota, Wolska & Gruzewska 2015).

Produtos fitoquímicos atuam na redução da atividade metabólica, disrupção da membrana celular e redução da produção de biomassa (Porto 2016). O mecanismo de atividade parece estar envolvido na natureza hidrofóbica dos metabólitos e na capacidade de eles atuarem na membrana, causando falha do controle quimiosmótico (Al-Jumaili, Kumar, Bazaka & Jacob 2018), mas não foi totalmente esclarecido e, em alguns casos, a identidade da molécula ainda é desconhecida (Pompilio et al. 2022).

Pesquisas anteriores concluíram que a utilização de produtos naturais em cateteres urinários reduziram significativamente a colonização (Jordan, Malic, Waters, Stickler & Williams 2015) e a adesão bacteriana (Adesina, Nwinyi & Olugbuyiro 2015), apresentando efeito antibiofilme (Cai et al. 2014; Namasivayam & Roy 2013; Akhlaghi-Ardekani, Mohebbi-Kalhari, Samimi & Karazhyan 2021), com resultados mais promissores do que antibióticos padrão (Ezeonu, Ayalogu & Esimone 2009).

Lócio (2019) isolou fungos endofíticos de *Anadenanthera macrocarpa* (Angico vermelho), no qual 70,8% dos extratos de metabólitos secundários dos fungos endofíticos da apresentaram atividade antibacteriana e 39,28% dos fungos endofíticos isolados, mostraram-se produtores de moléculas antibióticas contra bactérias *S. aureus* e *E. coli*.

Nascimento e colaboradores (2014) avaliaram o efeito de 44 de fungos filamentosos da caatinga quanto a atividade antimicrobiana, no qual 86,36% dos fungos apresentaram atividade contra *E. coli* e *S. aureus*, produzindo halos de até 33 mm de diâmetro para *E. coli*, sendo esta medida superior ao controle positivo com amoxicilina, que obteve halo de 30 mm.

Chagas e colaboradores (2017) testaram ação antimicrobiana de 116 fungos endofíticos isolados das cascas de *Hancornia speciosa*, na qual 33,6% dos fungos apresentaram atividade antimicrobiana contra bactérias gram-positivas, bactérias gram-negativas e leveduras patogênicas. Os resultados de Silva et al. (2018) também confirmaram que fungos endofíticos isolados de plantas do semiárido alagoano tem potencial contra *E. coli*, *S. aureus* e *P. aeruginosa*.

Outra pesquisa avaliou metabólitos de espécies endofíticas de *Trichoderma* isolados de planta *Vinca*, encontrados no Irã, obtendo resultado positivo na bioatividade do extrato de acetato de etila, em comparação com a bioatividade do extrato de metanol frente a bactérias patogênicas *S. aureus* e *E. coli* (Leylaie & Zafari 2018).

O alcalóide Aziridina, 1-(2-aminoetil)- isolado de fungo endofítico exibiu potência antibacteriana, antibiofilme e antilarval, incluindo cepas multirresistentes (Santra, Maity & Banerjee, 2022). O metabólito cumarina foi capaz de inibir a formação do biofilme de *P. aeruginosa* em até 78% e reduzir a contagem de colônias sésseis (Urquhart et al. 2020). Corroborando, compostos fenólicos como ácido p-cumárico, ácido elágico e Kaempferol apresentaram propriedades antibiofilme superiores a 70% (Nassima, Nassima & Riadh 2019).

Metabólitos secundários também apresentaram bons resultados contra a formação de biofilme em cateter urinário e deteriorização da arquitetura do biofilme em *Proteus mirabilis*, com propriedades anti-quorum sensing promissoras, além de redução visível no número de microcolônias (Younis, Usup & Ahmad 2016). Outro estudo determinou efeito antimicrobiano contra cepas uropatogênicas de *E. coli* pela presença de polifenóis, taninos, flavonóides, rutina e quercetina (Vamanu, Dinu, Luntraru & Suciú 2021).

Contudo, as pesquisas existentes não foram suficientes para conter a problemática, a fabricação de revestimentos perpassa por desafios, principalmente pela formação de biofilmes cristalinos em cateteres urinários (Coad et al. 2016) e colonização de lúmen de cateter (Werneburg et al. 2020).

De modo geral, os estudos demonstram a potencialidade dos compostos produzidos por fungos endofíticos para o controle de microrganismos patogênicos, enfatizando a atividade biológicas antibacteriana, todavia, poucas pesquisas abordam a aplicação de metabólitos secundários em cateteres e dispositivos médicos.

7 CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS FUTURAS

Estratégias empregando compostos naturais obtidos de fungos endofíticos para controle de infecções vem demonstrando resultados promissores, podendo ser explorados quanto ao uso em dispositivos médicos, como os cateteres urinários. Além disso, podem apresentar uma contribuição valiosa para o controle das infecções por bactérias resistentes a antibióticos.

A literatura contém várias pesquisas descrevendo fungos endofíticos extraídos de plantas bem como compostos bioativos com atividades biológicas diversas, especialmente a antimicrobiana em microrganismos, mas carece sobre a utilização destes em dispositivos médicos, como os cateteres. Contudo, em meio a biodiversidade brasileira há muitos compostos a se explorar e principalmente é necessária uma maior atenção para alavancar nas aplicações destes compostos de forma efetiva, permitindo o desenvolvimento de produtos biotecnológicos.

CONFLITOS DE INTERESSE

Os autores declaram não haver conflitos de interesse.

CONTRIBUIÇÃO DOS AUTORES

Marcomini E.K. realizou concepção do estudo, busca de dados na literatura e redação do manuscrito. Bernardi-Wenzel J. supervisionou todas as etapas do estudo e contribuiu para concepção e redação do manuscrito.

REFERÊNCIAS

- Abad, C.L., Sufdar, N. (2011). Catheter related bloodstream infections. *Infections disease*, special edition, 84-98.
- Adeleke, B. S., Babalola, O.O. (2021) Pharmacological Potential of Fungal Endophytes Associated with Medicinal Plants: A Review. *J Fungi* 7,147.
- Adesina, T.D., Nwinyi, O.C., Olugbuyiro, J.A.O. (2015) Prevention of Bacterial Biofilms Formation on Urinary Catheter by Selected Plant Extracts. *Pakistan Journal of Biological Sciences* 18, 67-73.

Akhlaghi-Ardekani, N., Mohebbi-Kalhari, D., Samimi, A., Karazhyan, R. (2021). Improving Antibacterial and Anti-biofilmic properties of urological catheters with Eucalyptus, Rosemary, Green tea and Ziziphora extracts by impregnation method. *Research Square* **10**.

Al-Jumaili, A., Kumar, A., Bazaka, K., Jacob, M. V. (2018) Plant Secondary Metabolite-Derived Polymers: A Potential Approach to Develop Antimicrobial Films. *Polymers* **10**, 5, 515.

Alves, L.C., Carlini, N.R.B.S., Anna, V.S., Biondo, E. (2020) Compostos fenólicos, atividade antibacteriana e análise sensorial de pétalas de ipê amarelo (*Handroanthus spp.*) In: Simpósio de segurança alimentar. Inovação com sustentabilidade 1-5.

Andersen, M.J., Flores-Mireles, A.L. (2020) Urinary Catheter Coating Modifications: The Race against Catheter-Associated Infections. *Coatings* **10**,23.

Anjos, M.K., Azevedo, T.G.L., D'êça Junior, A., Silva, R.A.R, Stipp, M.A.C, Paes, G.O. (2020) Incidents associated with delayed bladder catheterization in hospitalized patients: an integrative review. *Research, Society and Development* **9**, 8, e41985115.

Anjum, S., Abbasi, B.H., Shinwari, Z.K. (2016) Plant-mediated green synthesis of silver nanoparticles for biomedical applications: challenges and opportunities. *Pak. J. Bot.* **48**, 4, 1731-1760.

Anjum, S., Singh, S., Benedicte, L., Roger, P., Panigrahi, M., Gupta, B. (2017) Biomodification Strategies for the Development of Antimicrobial Urinary Catheters: Overview and Advances. *Glob Chall* **2**,1, 1700068.

Anvisa (2017). Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária Medidas de Prevenção de Infecção Relacionada à Assistência à Saúde. Brasília: Anvisa.

Arnosso, B.J.M., Costa, G.F., Chmidt, B. (2019) Bioavailability and classification of phenolic compounds. *Nutrição Brasil* **18**,1, 39-48.

Astolfi Filho, S., Silva, C.G.N., Bigi, M.F.M.A. (2014) Bioprospecção e biotecnologia. *Parc Estrat* **19**, 38, 45-80.

Barbosa, L.R., Mota, É.C., Oliveira, A.C. (2019) Infecção do trato urinário associada ao cateter vesical em unidade de terapia intensiva. *Revista de Epidemiologia e Controle de Infecção* **9**,2.

Batista, O.M.A, Monteiro, R.M., Machado, M.B, Ferreira, A.M., Valle, A.R.M, Watanabe, E., Madeiro, M.Z.A., Moura, M.E.B. (2018) Cateter urinário: o tempo de exposição e calibre podem influenciar na formação de biofilme? *Acta Paul Enferm* **31**, 5.

Bedenic, B., Sardelic, S., Bogdanic, M., Zarfel, G., Beader, N., Suto, S., Krilanovic, M., Vranes, J. (2021) *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC) in urinary infection isolates. *Archives of Microbiology* **203**, 4, 1825-1831.

Beebout, C.J., Eberly, A.R., Werby, S.H, Reasoner, S.A., Brannon, J.R., Shuvro, D., Fitzgerald, M.J., Huggins, M.M., Clayton, D.B., Cegelski, L., Hadjifrangiskou, M.(2020) Respiratory heterogeneity shapes biofilm formation and host colonization in uropathogenic *Escherichia coli*. *mBio* **10**, 02400-18.

Belfield, K., Chen, X., Smith, E.F., Ashraf, W., Bayston, R. (2019) An antimicrobial impregnated urinary catheter that reduces mineral encrustation and prevents colonisation by multi-drug resistant organisms for up to 12 weeks. *Acta Biomaterialia* **90**, 157-168.

Bhardwaj, A., Agrawal, P.K. (2014) A Review fungal endophytes: as a store house of bioactive compound. *World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences* **3**, 9,228–237.

Boecke, T.P., Gandra, S., Ashok, A., Caudron, Q., Grenfell, B.T., Levin, S.A., Laxminarayan, R. (2014) Global antibiotic consumption 2000 to 2010: an analysis of national pharmaceutical sales data. *The Lancet infectious diseases* **14**, 8,742-750.

Brasil (2015). Lei nº 13.123, de 20 de maio de 2015. Dispõe sobre o acesso ao patrimônio genético, sobre a proteção e o acesso ao conhecimento tradicional associado. Diário oficial da união. Brasília. Disponível em: http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2015-2018/2015/lei/113123.htm. Acesso em: 22 mai. 2021.

Brasil (2021). Ministério do Meio Ambiente. Biomas. Mata atlântica. Disponível: https://antigo.mma.gov.br/biomas/mata-atl%C3%A2ntica_emdesenvolvimento.html. Acesso em: 22 set. 2021.

Cai, T. et al. (2014) Solidago, orthosiphon, birch and cranberry extracts can decrease microbial colonization and biofilm development in indwelling urinary catheter: a microbiologic and ultrastructural pilot study. *World J Urol* **32**, 1007–1014.

Card, S.D., Hume, D.E., Roodi, D., Gill, C.R.M., Millner, J.P., Johnson, R.D. (2015) Beneficial endophytic microorganisms of Brassica – A review. *Biological Control* **90**,102–112.

Cattó, C., Villa, F., Cappitell, F. (2018) Recent progress in bio-inspired biofilm-resistant polymeric surfaces. *Critical Reviews in Microbiology* **44**, 55, 633-652.

Chagas, M.B.O., Santos, I.P., Silva, L.C.N., Correia, M.T.D.S, Araújo, J.M., Cavalcanti, M.D.S., Lima, V.L.M. (2017). Antimicrobial Activity of Cultivable Endophytic Fungi Associated with *Hancornia Speciosa* Gomes Bark. *Open Microbiol J* **11**, 179–188.

Chen, L., Zhang, Q.Y, Jia, M., Ming, Q.L., Yue, W., Rahman, K., Qin, L.P., Han, T.(2016) Endophytic fungi with antitumor activities: Their occurrence and anticancer compounds. *Critical Reviews in Microbiology* **42**, 3, 454-473.

Choze, R. (2004) Técnicas de separação e identificação empregadas na análise de produtos naturais de plantas. Trabalho de Conclusão de Curso. Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

Coad, B.R., Griesser, H.J., Peleg, A.Y., Traven, A. (2016) Anti-infective Surface Coatings: Design and Therapeutic Promise against Device-Associated Infections. *PLoS Pathog* **12**,6, e1005598.

Conover, M.S., Hadjifrangiskou, M., Palermo, J.J., Hibbing, M.E., Dodson, K.W., Hultgren, S.J. (2016) Metabolic requirements of *Escherichia coli* in intracellular bacterial communities during urinary tract infection pathogenesis. *mBio* **7**, 2, e00104-16.

Costa, R. (2009). Avaliação do Potencial Antioxidante da Folha de *Cydonia oblonga* Miller. Monografia. Porto, Universidade Fernando Pessoa.

Bayramov, D.F., AnnNeff, J. (2017) Beyond conventional antibiotics — New directions for combination products to combat biofilm. *Advanced Drug Delivery Reviews* **112**, 48-60.

David, B., Wolfender, J.L., Dias, D.A. (2015) The pharmaceutical industry and natural products: historical status and new trends. *Phytochemistry Reviews* **14**, 2, 299–315.

Eforzza, R.C. et al. (2010) Catálogo de plantas e fungos do Brasil. Introdução: as angiospermas do Brasil. *Rio de Janeiro* **1**, 78-89.

Ezeonu, I.M., Ayalogu, V.O., Esimone, C.O. (2009) Studies on the Use of Plant Extracts for the Prevention of Bacterial Biofilms on Urinary Catheters. *Nig J. Biotech* **20**, 1.

Faustino, C.M.C., Lemos, S.M.C., Monge, N., Ribeiro, I.A.C. (2020) A scope at antifouling strategies to prevent catheter-associated infections. *Advances in Colloid and Interface Science* **284**, 102230.

Felipe, L.O., Bicas, J.L. (2017) Terpenos, aromas e a química dos compostos naturais. *Química Nova na Escola* **39**, 21-11.

Flores-Mireles, A.L., Hreha, T.N., Hustand, D.A. (2019) Pathophysiology, Treatment, and Prevention of Catheter-Associated Urinary Tract Infection. *Top Spinal Cord Inj Rehabil* **25**, 3, 228–240.

Florindo R.H.S. (2019) Bioprospecção de metabólitos secundários bioativos produzidos por fungos endofíticos associados à *Piper* sp. coletada no Parque Estadual do Rio Doce, Minas Gerais. 109f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Ouro Preto. Instituto de Ciências Exatas e Biológicas.

Francolini, I., Vuotto, C., Piozzi, A., Donelli, G. (2017) Antifouling and antimicrobial biomaterials: an overview. *Journal of pathology, microbiology and immunology* **125**, 4, 392-417.

Freitas, S.T.F., Benvindo-Souza, M., Teodoro, L.O., Goulart, M.M.P., Pinto, T.F.E., Azevedo, M.O., Valentin, A.M., Pereira, P.S., Santos, L.R.S., Dyszy, F.H. (2020) Aspectos taxonômicos da bioprospecção no brasil: tendência científica. *Oecologia Australis* **24**, 4, 770-780.

Fristich, C.J., Rice, L.B., Arias, C.A. (2014) Enterococcal Infection—Treatment and Antibiotic Resistance. In: Gilmore, M.S. et al. Enterococci: From Commensals to Leading Causes of Drug Resistant Infection. *Boston: Massachusetts Eye and Ear Infirmary*.

Gaston, J.R., Andersen, M.J., Johnson, A.O., Bair, K.L., Sullivan, C.M., Guterman, L.B., White, A.N., Brauer, A.L., Lerman, B.S., Flores-Mireles, A.L., Armbruster, C.E. (2020). *Enterococcus faecalis* Polymicrobial Interactions Facilitate Biofilm Formation, Antibiotic Recalcitrance, and Persistent Colonization of the Catheterized Urinary Tract. *Pathogens* **9**, 10, 835.

Gayani, B., Dilhari, A., Kottegoda, N., Ratnaweera, D.R., Weerasekera, M.M. (2021) Reduced Crystalline Biofilm Formation on Superhydrophobic Silicone Urinary Catheter Materials. *ACS Omega* **6**, 17, 11488–11496.

Geng, V. et al. (2012) Catheterisation Indwelling catheters in adults – Urethral and Suprapubic. European Association of Urology Nurses.

Gioppo, A., Zancanaro, V., Bellaver, E.H. (2019) Atividade antibacteriana do óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* frente a isolados multirresistentes produtores de ESBL e KPC causadores de infecções hospitalares. *Biotemas* **32**, 3, 35-42.

Gonçalves, B., Bastos, E., Hanna, S. (2017) Prospecção tecnológica de fungos endófitos e aplicações na indústria farmacêutica. *Cad. Prospec.* **10**, 1, 56-67.

Gonçalves, G.R., Silva, K.S.B., Silva, C.F., Aquino, S.R., Naue, C.R. (2020) Perfil bacteriano de uroculturas coletadas em pacientes internados na UTI de um Hospital Universitário de Pernambuco. *Revista de Ensino, Ciência e Inovação em Saúde* **1**,1, 67-76.

González-Vera, N., Shukla, A. (2020) Advances in Biomaterials for the Prevention and Disruption of *Candida* Biofilms. *Front Microbiol* **11**.

Green, E.R., Mecsas, J. (2016) Bacterial Secretion Systems—An overview. *Microbiol Spectr* **4**, 1.

Gunardi, W.D.A., Karuniawati, A., Umbas, R., Bardosono, S., Lydia, A., Soebandrio, A., Safari, D. (2021) Biofilm-Producing Bacteria and Risk Factors (Gender and Duration of Catheterization) Characterized as Catheter-Associated Biofilm Formation. *International Journal of Microbiology* 8869275.

Guyton, A.C., Hall, J.E. (2017) Tratado de Fisiologia Médica. Editora Elsevier. 13^a ed.

Hardoim, P.R., Van Overbeek, L.S., Berg, G., Pirttilä, A.M., Compant, S., Campisano, A., Döring, M., Sessitsch, A. (2015) The Hidden World within Plants: Ecological and Evolutionary Considerations for Defining Functioning of Microbial Endophytes. *Microbiol Mol Biol Rev* **79**, 3, 293–320.

Hasan, M.E., Shariar, A., Shams, F., Nath, A.K., Emran, T.B. (2020) Correlation between biofilm formation and antimicrobial susceptibility pattern toward extended spectrum β -lactamase (ESBL)- and non-ESBL-producing uropathogenic bacteria. *Journal of Basic and Clinical Physiology and Pharmacology* **13**, 32, 2.

Hosseini, S.S., Ghaemi, E., Koohsar, F. (2018) Influence of ZnO nanoparticles on *Candida albicans* isolates biofilm formed on the urinary catheter. *Iran J Microbiol* **10**, 6, 424–432.

Huber, L.S., Rodriguez-Amaya, D.B. (2008) Flavonóis e flavonas: fontes brasileiras e fatores que influenciam a composição em alimentos. *Alim. Nutr* **19**, 1, 97-108.

Hughes, E. (2016) Endophytic Fungi Diversity, Characterization and Biocontrol. *Microbiology Research Advances*, 1-163.

Ionescu, A.C., Brambilla, E., Sighinolfi, M.C., Mattinac, R. (2021) A new urinary catheter design reduces in-vitro biofilm formation by influencing hydrodynamics. *Journal of Hospital Infection* **114**,153-162.

Jenks, J.D., Cornely, O.A., Chen, S.C.A., Thompson, G.R., Hoenigl, M. (2020) Breakthrough invasive fungal infections: Who is at risk? *Mycoses* **63**, 1021-1032.

Jia, M.A., Chen, L., Xin, H.L., Zheng, C.J., Rahman, K., Han, T., Qin, L.P (2016) Friendly Relationship between Endophytic Fungi and Medicinal Plants: A Systematic Review. *Front. Microbiol* **7**, 906.

Jordan, R.P.C., Malic, S., Waters, M.G.J., Stickler, D.J., Williams, D.W. (2015) Development of an antimicrobial urinary catheter to inhibit urinary catheter encrustation. *Microbiology Discovery* **3**.

Karimi, S., Salahinejad, E., Sharifi, E., Nourian, A., Tayebi, L. (2018) Bioperformance of chitosan/fluoride-doped diopside nanocomposite coatings deposited on medical stainless steel. *Carbohydrate Polymers* **202**, 600-610.

Kart, D., Kustimur, A.S., Sağiroğlu, M., Kalkancı, A. (2017) Evaluation of Antimicrobial Durability and Anti-Biofilm Effects in Urinary Catheters Against *Enterococcus faecalis* Clinical Isolates and Reference Strains. *Balkan Med J* **34**, 6, 546-552.

Khare, E., Mishra, J., Arora, N.K. (2018) Multifaceted Interactions Between Endophytes and Plant: Developments and Prospects. *Front. Microbiol* **15**, 9, 2732.

Kot, B., Wicha, J., Piechota, M., Wolska, K., Gruzewska, A. (2015) Antibiofilm activity of trans-cinnamaldehyde, p-coumaric, and ferulic acids on uropathogenic *Escherichia coli*. *Turk J Med Sci* **45**, 919-924.

Kranz, J., Schmidt, S., Wagenlehner, F., Schneidewind, L. (2020) Catheter-Associated Urinary Tract Infections in Adult Patients. Preventive Strategies and Treatment Options. *Dtsch Arztebl Int* **117**, 6, 83–88.

Kumar, S., Bose, A. (2020) Comparison of Bacterial Colonization and the Biofilm Formation between Indwelling Pure Silicone and Silicone Coated Latex Catheters: A Prospective and Observational Study. *International Journal of Contemporary Surgery* **8**, 1.

Lata, R., Chowdhury, S., Gond, S.K., White, J.F. Jr. (2018) Induction of abiotic stress tolerance in plants by endophytic microbes. *Applied Microbiology* **66**, 4, 268-276.

Lawrence, E.L., Turner, I.G. (2005) Materials for urinary catheters: a review of their history and development in the UK. *Med Eng Phys* **27**, 6, 443-53.

Lee, K., Park, S.J., Choi, S., Uh, Y., Park, J.Y., Hee, K. (2017) The Influence of Urinary Catheter Materials on Forming Biofilms of Microorganisms. *J. Bacteriol. Virol* **47**, 1, 32-40.

Levinson, W. (2011) Microbiologia médica e imunologia. 10. ed. Porto Alegre: AMGH.

Leylaie, S., Zafari, D. (2018) Antiproliferative and Antimicrobial Activities of Secondary Metabolites and Phylogenetic Study of Endophytic *Trichoderma* Species From *Vinca* Plants. *Frente. Microbiol* **11**, 9, 1484.

Livermore, D. M. (2012) Fourteen years in resistance. *International Journal of Antimicrobial Agents* **39**, 4, 283-294.

Lócio, C.J.F. (2019) Avaliação das atividades antibióticas e antiparasitária de metabólitos secundários de fungos endofíticos da *Anadenanthera macrocarpa*. 69f. Monografia (Trabalho de Conclusão de Curso). Engenharia de Biotecnologia e Bioprocessos. Universidade Federal de Campina Grande, Paraíba – Brasil.

Lo, J., Lange, D., Chew, B.H. (2014) Ureteral Stents and Foley Catheters-Associated Urinary Tract Infections: The Role of Coatings and Materials in Infection Prevention. *Antibiotics* **2014**, 3, 1, 87-97;

Machul, A., Mikolajczyk, D., Futyra, A.R., Heczko, P.B., Strus, M., Arruebo, M., Stochel, G., Kyzioł, A. (2015) Study on inhibitory activity of chitosan-based materials against biofilm producing *Pseudomonas Aeruginosa* strains. *Journal of Biomaterials Applications* **30**, 3, 269–278.

Malinovski, E., Estoril, A.L.A. (2021) Bactérias mais frequentes em infecções do trato urinário. *Revista Saúde e Meio Ambiente* **12**, 1, 121-134.

Marçal, T.V.G., Costa, L.F., Nicoletti, D.R., Fernandes, M.T.C., Amorin, B., Hermes, D. (2021) Incidência de KPC (*Klebsiella Pneumoniae Carbapenemase*) em adultos internados em hospitais nas regiões do Brasil de 2006 a 2016: revisão bibliográfica. *Saúde Coletiva (Barueri)* **11**, 62, 5174-5191.

Marino, P.L. (2015) Cateteres vasculares. Compendio de UTI. Capítulo 1. 4ª ed.

Martin, G.D.A. (2018) Los compuestos fenólicos: un acercamiento a su biosíntesis, síntesis y actividad biológica. *Revista de Investigación Agraria y Ambiental* **9**, 1.

Mitchell, K.F., Zarnowski, R., Andes, A.R. (2016) The extracellular matrix of fungal biofilms. *Adv. Exp. Med. Biol* **931**, 21-35.

Moderno, P. (2009). Chá: da crença popular à verdade científica. Monografia. Porto, Universidade Fernando Pessoa.

Montenegro-Díaz, B., Tafur-Ramírez, R., Díaz-Vélez, C., Mogollon, J.F. (2016) Infecciones intrahospitalarias del tracto urinario en servicios críticos de un hospital público de Chiclayo, Perú (2009-2014). *Acta méd. Peru* **33**, 3, 189-194.

Moreira, M.M.B. (2013) Diterpenos com atividade antitumoral frente células leucêmicas: uma revisão. Trabalho de Conclusão de Curso. Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa – PB.

Moreno, A.H., Possebon, L., Sant'ana, M., Souza, H.R., Pilon, M.M.I., Girol, A.P. (2018) Avaliação da atividade antimicrobiana e citotoxicidade hemolítica em diferentes extratos vegetais. *Arq. Ciênc. Saúde* **25**, 1, 11-12.

Moura, S.S.T. (2020) Avaliação da atividade antimicrobiana de fungos endofíticos isolados de plantas no Brasil contra patógenos humanos. 88p. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal de Santa Catarina. Centro de ciências biológicas. Programa de pós-graduação em biotecnologia e biociências. Florianópolis-SC.

Mulla, S., Kumar, A., Rajdev, S. (2016) Comparison of MIC with MBEC Assay for in Vitro Antimicrobial Susceptibility Testing in Biofilm Forming Clinical Bacterial Isolates. *Advances in Microbiology* **6**, 02, 73-78.

Musafer, H.K., Kuchma, S.L., Naimie, A.A., Schwartzman, J.D., Al-Mathkhury, H.J., O'Toole, G.A. (2014) Investigating the Link Between Imipenem Resistance and Biofilm Formation by *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbial Ecology* **68**, 1.

Nair, D.N., Padmavathy, S. (2014) Impact of endophytic microorganisms on plants, environment and humans. *The Scientific World Journal*, **22**, 250693.

Namasivayam, K.R.S, Roy, E.A. (2013) Anti biofilm effect of medicinal plant extracts against clinical isolate of biofilm of *Escherichia coli*. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences* **5**, 2.

Nascimento, R.F.Q., Sousa, B.L.P., Bezerra, R.M.S., Cavalcanti, R.M.F., Silva, R.B., Queiroz, J.C.F. (2014) Prospecção de fungos da caatinga produtores de antibióticos. *Revista Saúde e Ciência On Line* **3**, 3, 76-85.

Nassima, B., Nassima, B. & Riadh, K. (2019) Antimicrobial and antibiofilm activities of phenolic compounds extracted from *Populus nigra* and *Populus alba* buds (Algeria). *Braz. J. Pharm. Sci.* **55**.

Pompilio, A., Scocchi, M., Mangoni, M.L., Shirooie, S., Serio, A., Costa, Y.F.G., Alves, M. S., Karatoprak, G.S., Süntar, I., Khan, H., Bonaventura, G. D. (2022) Bioactive compounds: a goldmine for defining new strategies against pathogenic bacterial biofilms? *Critical Reviews in Microbiology*.

Newman, J.W., Floyd, R.V., Fothergill, J.L. (2017) The contribution of *Pseudomonas aeruginosa* virulence factors and host factors in the establishment of urinary tract infections. *FEMS Microbiology Letters* **364**, 15.

Oliveira, J., Barreto, A., Silva, L., Rhoden, S. (2021) Fungos, diversidade e prospecção no Brasil: Um recurso pouco explorado? *Metodologias E Aprendizado* **4**, 149–163.

Pamphile, J.A., Costa, A.T., Rosseto, P., Polonio, J.C., Pereira, J.O., Azevedo, J.L. (2017) Aplicações biotecnológicas de metabólitos secundários extraídos de fungos endofíticos: o caso do *Colletotrichum* sp. *Revista Uningá* **53**, 1.

Pandey, A., Tripathi, S. (2014) Concept of standardization, extraction and pre phytochemical screening strategies for herbal drug. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, **2**, 5, 115-119.

Pelling, H., Nzakizwanayo, J., Milo, S., Denham, E.L., MacFarlane, W.M., Bock, L.J, Sutton, J.M., Jones, B.V. (2019) Bacterial biofilm formation on indwelling urethral catheters. *Journal of Applied Microbiology, Special Issue: Biofilm in healthcare settings and their control* 68, 4, 277-293.

Pereira, A.L., Pita, J.R. (2005) Alexander Fleming (1881-1955) Da descoberta da penicilina (1928) ao Prémio Nobel (1945). *Revista da Faculdade de Letras* **6**, 129-151.

Porto, J.R.M. (2016) Development of new antibiofilm strategies using plant-based molecules and analogues. Dissertation for Master in Bioengineering. Faculty of Engineering of the University of Porto (FEUP), Portugal.

Rabin, N., Zheng, Y., Opoku-Temeng, C., Du, Y., Bonsu, E., Sintim, H.O. (2015) Biofilm formation mechanisms and targets for developing antibiofilm agentes. *Future medicinal chemistry* **7**, 4.

Rajamanikyam, M., Vadlapudi, V., Amanchy, R., Upadhyayula, S. M. (2017) Endophytic Fungi as Novel Resources of natural Therapeutics. *Braz. arch. biol. Technol* **60**.

Rahman, S., Rahman, L., Khalil, A.T., Ali, N., Zia, D., Ali, M., Shinwari, Z.K. (2019) Endophyte-mediated synthesis of silver nanoparticles and their biological applications. *Applied Microbiology and Biotechnology* **103**, 2551–2569.

Ramírez-Castillo, F.Y., Moreno-Flores, A.C., Avelar-González, F.J., Márquez-Díaz, F., Harel, J., Guerrero-Barrera, A.L. (2018) An evaluation of multidrug-resistant *Escherichia coli* isolates in urinary tract infections from Aguascalientes, Mexico: cross-sectional study. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials* **17**, 34.

Ramos, A.C.S., Santos, E.R.S., Rodriguez, J.A.L., Macedo, M.L.H. (2018). Obtenção de filme de quitosana dopado com extrato de *Anacardium occidentale* para revestimento de cateter venoso. *Semana de Pesquisa e Extensão da Universidade Tiradentes* **19**.

Reyes-Silva, J., Salazar, C.A., Cortes-Rios, H.H. (2020) Secondary Metabolites of Plants (angiosperms) and Some Interesting Uses. *Publicación semestral* **3**, 16-18.

Rodrigues, F.A., Pimenta, V.S.C., Braga, K., Araújo, E.G. (2016) Obtenção de extratos de plantas do cerrado. *Enciclopédia biosfera* **13**, 23, 2016.

Romling, U., Kjelleberg, S., Normark, S., Nyman, L., Uhlin, B.E., Åkerlund, B. (2014) Microbial biofilm formation: a need to act. *Journal of internal Medicine* **276**, 2.

Romling, U., Balsalobre, C. (2012) Biofilm infections, their resilience to therapy and innovative treatment strategies. *Journal of internal medicine* **272**, 6, 541-561.

Saccaro, J., Nilo, L. (2011) Desafios da bioprospecção no Brasil. Instituto de Pesquisa Econômica Aplicada. Texto para Discussão, **1569**. IPEA: Brasília-DF.

Salzani, M.G.B., Maior, F.N.S., Santos, C.S.M., Lima, I.O., Silva, S.O.P., Mendes, R.S. (2019) Urinary infections: seeking to evidence the most used drugs in the treatment of these pathologies. *Temas em saúde* **19**, 3, 318-356.

Sampaio, J.S. (2018) Prevenção de infecções hospitalares causadas por *Candida albicans* : uma nova abordagem baseada no revestimento polimérico de cateteres. 2018. 38 f. Monografia (Graduação em Farmácia) - Escola de Farmácia, Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto.

Santos, D.S., Rodrigues, M.M.F. (2017) Atividades farmacológicas dos flavonoides: um estudo de revisão. *Estação Científica (UNIFAP)* **7**, 3, 29-35.

Santra, H.K., Maity, S., Banerjee, D. (2022) Production of Bioactive Compounds with Broad Spectrum Bactericidal Action, Bio-Film Inhibition and Antilarval Potential by the Secondary Metabolites of the Endophytic Fungus *Cochliobolus* sp. APS1 Isolated from the Indian Medicinal Herb *Andrographis paniculata*. *Molecules* **27**, 5, 1459.

Sasani, E., Khodavaisy, S., Rezaie, S., Salehi, M., Yadegari, M.H. (2021) The relationship between biofilm formation and mortality in patients with *Candida tropicalis* candidemia. *Microb. Pathog* **155**, 104889.

Scharf, D.H., Heinekamp, T., Brakhage, A.A. (2014) Human and Plant Fungal Pathogens: The Role of Secondary Metabolites. *PLoS Pathogens*, **10**, 1, 10–12.

Schulz, B., Haas, S., Junker, C., Andrée, N., Schobert, M. (2015) Fungal endophytes are involved in multiple balanced antagonisms. *Current Science* **109**, 1, 15 39–45.

Scott, H.M, Acuff, G., Bergeron, G., Bourassa, M.W., Simjee, S., Singer, R.S (2019) Antimicrobial resistance in a One Health context: exploring complexities, seeking solutions, and communicating risks. *Annals of de New York academy of sciences* **1441**, 1.

Sharma, G., Sharma, S., Sharma, P., Chandola, D., Dang, S., Gupta, S. et al.(2016) *Escherichia coli* biofilm: development and therapeutic strategies. *Journal of Applied Microbiology* **121**, 2, 309-319.

Sierra-Diaz, E., Hernandez-Rios, C.J., Bravo-Cuellar, A. (2019) Antibiotic resistance: Microbiological profile of urinary tract infections in Mexico. *Cirugía y Cirujanos* **87**, 176-182.

Silva, L.R., Canabarro, A.M.C.A, Nascimento, M.M.B., Jesus, E.V.O., Santos, T.M.C., Melo, I.L., Almeida, A.C.P.S., Silva, J.M. (2018) Bioativos antimicrobianos produzidos por fungos endofíticos associados a plantas do semiárido. *Ciência Agrícola* **16**, 5-7.

Silva, R.S., Silva, M.W.F., Bezerra, G.B., Ramos, C.S. (2021) Chemical profiles and antimicrobial activities of plants utilized in Brazilian traditional medicine. *Eclética Química Journal* **46**, 1, 35-40.

Singh, S., Singh, S.K., Chowdhury, I., Singh, R. (2017) Understanding the mechanism of bacterial biofilms resistance to antimicrobial agents. *Open Microbiol J* **11**, 53–62.

Singha, P., Locklin, J., Handa, H. (2017) A review of the recent advances in antimicrobial coatings for urinary catheters. *Acta Biomaterialia* **50**, 20-40.

Soares, M.A., Rodrigues, N.M., Menezes, M.R.O., Gerace, D.N., Duarte, C.M., Brandão, P.M., Borges, L. F. de A. (2019) Microrganismos multirresistentes nas mãos de profissionais de saúde em Unidades de Terapia Intensiva. *Revista de Epidemiologia e Controle de Infecção* **9**, 3, 187-192.

Sousa, A.C.J., Oliveira, J.S., Porcy, C., Souza, M.J.C., Menezes, R.A.O. (2019) Potencial antimicrobiano de extratos vegetais frente a cepas bacterianas de interesse médico em Macapá, Amapá, Amazônia Brasileira. *Diagn Tratamento* **24**, 3, 85-90.

Souza, A. D. (2014) Isolamento de alcaloides e atividades biológicas de espécies de *Lauraceae* da Amazônia. Dissertação de Mestrado em Química. Universidade Federal do Amazonas.
Younis, KM, Usup, G. & Ahmad, A. (2016) Metabólitos secundários produzidos por *Streptomyces* marinhos como antibiofilme e inibidor quorum-sensing do uropatógeno *Proteus mirabilis*. *Environ Sci Pollut Res* **23**, 4756–4767.

Specian, V., Orlandelli, R.C., Felber, A.C., Azevedo, J.L., Pamphile, J.A. (2015) Metabólitos Secundários de Interesse Farmacêutico Produzidos por Fungos Endofíticos. *Journal of Health sciences* **16**, 4, 345-351.

Stickler, D.J. (2014) Clinical complications of urinary catheters caused by crystalline biofilms: something needs to be done. *J Intern Med* **276**, 2, 120-129.

Strobel, G. (2018) The Emergence of Endophytic Microbes and Their Biological Promise. *J. Fungi* **4**, 2, 57.

Tarabal, V.S., Silva, F.G., Sinisterra, R.D., Gonçalves, D., Silva, J., Granjeiro, J.M. (2021) Impact of DMPEI on Biofilm Adhesion on Latex Urinary Catheter. *Recent Patents on Biotechnology* **15**, 1, 51-66.

Tasneem, U., Yaisin, N., Nisa, I., Shah, F., Rasheed, U., Momin, F., Zaman, S., Qasim, M. (2018) Biofilm producing bacteria a serious threat to public health in developing countries. *J. Food Sci Nutr* **1**, 2, 25-31.

Tiago, K.P., Trindade, T.L., Soares, A.A., Assunção, D.O., Branches, O.J., Viana, R.O., Santos, L.B., Mello, E.L.S., Cruz, A.P.S., Costa, L.F.N., Macedo, A.K.G.V. (2020) Frequency and resistance of urocultures from patients interned in the Santarém-PA municipal hospital. *RBAC* **52**, 1, 64-70.

Tortora, G.J., Derrickson, B. (2016) Corpo humano. Fundamentos da Anatomia e Fisiologia. 10 ed. Artmed.

Trindade, J.S., Silva, E.G., Furtado, G.S., Carvalho, D., Bendelaque, D.F.R., Costa, R.E.A.R., Albuquerque, L.P., Silva, K.S.O., Rodrigues, R.S., Pinheiro, A.C.M., Pantoja, A.C.R., Vaz, G.L., Santos, C.C., Aguiar, V.F.F., Nogueira, M.C., Sa, A.M.M. (2020) Infecção relacionada à assistência à saúde: Prevalência em Unidade de Terapia Intensiva Adulto. *Society and Development* **9**, 9, e373997107.

Urquhart, C., Mota, A.D, Zarzicki, F., Casagrande, C., Alves, C.F.S, Clereci, D.J., Pinheiro, T.R., Bonez, P.C., Barin, T.M., Santo, R.C.V. (2020) Antibiofilm Activity of Cumarina front *Pseudomonas aeruginosa*. *Braz. J. of Develop* **6**, 10, 77261-77268.

Vallejo-Torres, L., Pujol, M., Shaw, E., Wiegand, I., Vigo, J.M., Stoddart, M., Grier, S., Gibbs, J., Vank, C., Cuperus, N., Heuvel, L., Eliakim-Raz, N., Carratala, J., Vuong, C., MacGowan, A., Babich, T., Leibovici, L., Addy, I., Morris, S. (2018) Custo dos pacientes hospitalizados devido a complicadas infecções do trato urinário: um estudo observacional retrospectivo em países com alta prevalência de bactérias Gram-negativas multidroga resistentes: o COMBACTE-MAGNET. Resgatando o estudo. *BMJ Open* **8**, 4, e020251.

Vamanu, E., Dinu, L.D., Luntraru, C.M., Suci, A. (2021) In Vitro Coliform Resistance to Bioactive Compounds in Urinary Infection, Assessed in a Lab Catheterization Model. *Applied Sciences* **11**, 9, 4315.

Vaz, J.M., Pezzoli, D., Chevallier, P., Campelo, C.S., Candiani, G., Mantovani, D. (2018a) Antibacterial Coatings Based on Chitosan for Pharmaceutical and Biomedical Applications. *Current Pharmaceutical Design* **24**, 8, 867.

Vaz, J.M., Taketa, T.B., Montelongo, J.H., Chevallier, P., Cotta, M.A., Mantovani, D., Beppu, M.M. (2018b) Antibacterial properties of chitosan-based coatings are affected by Spacer-length and molecular weight. *Applied Surface Science* **445**, 478–487.

Verma, A., Bhani, D., Tomar, V., Bachhiwal, R., Yadav, S. (2016) Differences in Bacterial Colonization and Biofilm Formation Property of Uropathogens between the Two most Commonly used Indwelling Urinary Catheters. *J Clin Diagn Res* **10**, 6.

Vipin, C., Mujeeburahiman, M., Arun, A.B., Ashwini, P., Mangesh, S.V., Rekha, P.D. (2019) Adaptation and diversification in virulence factors among urinary catheter-associated *Pseudomonas aeruginosa* isolates. *Journal of Applied Microbiology* **126**, 2, 641-650.

Vizzotto, M., Krolow, A.C., Weber, G.E.B. (2010) Metabólitos Secundários Encontrados em Plantas e sua Importância. *Embrapa Clima Temperado* **16**.

Walker, J.N., Flores-Mireles, A.L., Pinkner, C.L., Schreiber, H.L., Joens, M., Park, A.M., Protetzke, A.M., Bauman, T.M., Pinkner, J.S., Fitzpatrick, J.A.J., Desai, A., Gaparon, M.G., Hultgren, S.J. (2017) Catheterization alters bladder ecology to potentiate *Staphylococcus aureus* infection of the urinary tract. *PNAS* **114**, 41, 8721-8730.

Wani, Z.A., Ashraf, N., Mohiuddin, T., Hassan, S.R. (2015) Plant-endophyte 20 symbiosis, an ecological perspective. *Applied Microbiology and Biotechnology* **99**, 7, 2955–2965.

Werneburg, G.T., Nguyen, A., Henderson, N.S., Rackley, R.R., Shoskes, D.A., Sueur, A.L.L. et al. (2020) The Natural History and Composition of Urinary Catheter Biofilms: Early Uropathogen Colonization with Intraluminal and Distal Predominance. *The journal of urology* **203**, 2, 357-364.

Who (2019) Relatório para o secretário geral das Nações Unidas. Interagency coordination group on antimicrobial resistance. Não há tempo a perder: acautelar o futuro contra infecções resistentes aos medicamentos.

Wiley J. (2004) The Encyclopedia of Polymer Science and Technology. 4th Edition.

Winter, C.C., Lemos, J.A., Flores-Mireles, A.L. (2019) Biofilm assays on fibrinogen-coated silicone catheters and 96-well polystyrene plates. *Bio Protoc* **9**, 6, e3196.

Zarza, V.M.P, Mordani, S.M., Maldonado, A.M., Hernández, D.A., Georgina, S.G.S., López, R.V. (2019) *Pseudomonas aeruginosa*: patogenicidad y resistencia antimicrobiana en la infección urinaria. *Rev Chilena Infectol* **36**, 2, 180-189.

Zhang, R. (1999) Cis-1,4-Polyisoprene. Polymer data handbook. Oxford University Press Inc, UK, 607–19.

CAPÍTULO II

Artigo a ser submetido a American Journal of Infection Control

Efeito antimicrobiano e antibiofilme *in vitro* de compostos de fungos endofíticos isolados de *Handroanthus ochraceus* (Bignoniaceae)

Emilli Karine Marcomini¹, Juliana Bernardi-Wenzel¹

¹Programa de Pós-graduação em Biotecnologia – Universidade Federal do Paraná – Setor Palotina.

RESUMO

Fundamentos: Microrganismos endofíticos produtores de moléculas com atividades antimicrobianas são investigados para atuar na redução de infecções e biofilmes correlacionados a dispositivos médicos. Diante disso, o objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito antimicrobiano e antibiofilme de compostos de fungos endofíticos isolados de *Handroanthus ochraceus*. **Métodos:** Foram isolados fungos de flores de *H. ochraceus*, que tiveram seus metabólitos secundários obtidos por fermentação submersa. Os compostos foram testados frente a *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*, utilizando cateteres vesicais de demora de látex e silicone. **Resultados:** Nove fungos endofíticos apresentaram atividade antibacteriana na fração de acetato de etila, em sua maioria com efeito bacteriostático, com concentrações mínimas de 37,5% para *E. coli* e 25% para *P. aeruginosa*. O potencial de inibir a formação dos biofilmes foi superior quando comparado ao potencial de erradicar biofilmes já formados. A quantidade de compostos fenólicos totais dos extratos variou de 27,32 a 92,71 mgEAG.L⁻¹ e flavonoides de 4,36 a 40,52 mgEQ.L⁻¹. **Conclusão:** Os compostos isolados de *H. ochraceus* são promissores para utilização no controle de biofilmes microbianos e podem ser melhor explorados quanto a possibilidade de utilização para o recobrimento/impregnação de cateteres vesicais.

PALAVRAS-CHAVE: Biofilmes, endófitos, ipê amarelo, polifenóis, flavonoides, metabólitos secundários.

INTRODUÇÃO

O uso de plantas medicinais compõe um relato antigo da civilização humana, no qual no Brasil por seu arsenal de biodiversidade e heterogeneidade cultural, a bioprospecção tem se acentuado nas áreas biomédicas, especialmente para controle de infecções.^{1,2} A procura metódica por organismos, genes, enzimas e compostos, que possam ter atividades biológicas ou serem empregados na criação de produtos biotecnológicos, definem o termo bioprospecção, sendo considerada uma ferramenta de desenvolvimento do país.^{3,4}

A flora brasileira exibe diversidade de plantas, que contêm inúmeros constituintes fitoquímicos, além de um grande reservatório de microrganismos endofíticos, que podem ser investigados para atuar na redução de doenças e infecções.⁵

Endofíticos consistem em fungos ou bactérias, que colonizam e habitam espaços intracelulares de tecidos vegetais, em uma relação simbiótica, podendo produzir substâncias antimicrobianas e outros produtos de interesse biotecnológico,⁶ por meio de metabólitos secundários potenciais e ativos.⁷

Entre as infecções associadas a dispositivos médicos, destacam-se as Infecções de Trato Urinário Associadas a Cateter (ITU-AC),⁸ na qual o risco após a colocação de um cateter permanente, varia entre 3% a 7% a cada dia de uso,⁹ ocasionando complicações que trazem custos financeiros elevados aos sistemas de saúde, alcançando em média US\$ 2,800 dólares a cada episódio de ITU associado a bacteremia.¹⁰

Um estudo de coorte retrospectivo, realizado em 20 países da Europa e do Oriente Médio, identificou que pacientes com ITU complicada apresentaram 27% de falha no tratamento, bem como taxa de mortalidade de 9% aos 30 dias, em grande parte associada a utilização de cateteres.¹¹ ITU por *P. aeruginosa* está associadas à alta mortalidade, que aumenta significativamente na presença de patologias, como insuficiência renal crônica, doença hepática avançada e diabetes mellitus ou ainda na inadequação do tratamento antibiótico.¹²

Grande parte das infecções é ocasionada por *Escherichia coli*, que invade as células da bexiga pelo *pilus*, escapam de vesículas exocíticas, ocupam o citoplasma da célula, replicam-se e formam comunidades bacterianas intracelulares,¹³ causando incrustações compostas de fosfato de cálcio e magnésio.¹⁴ Entre as infecções nosocomiais mais frequentes associadas a bactérias multirresistentes, *P. aeruginosa* representam o pior prognóstico.¹⁵

Em relação a origem das infecções, os biofilmes geralmente estão envolvidos e estão frequentemente correlacionados a dispositivos médicos. Os biofilmes consistem em um complexo de microrganismos que crescem em colônias organizadas envoltas por uma matriz de substâncias poliméricas extracelulares (EPS), proteínas e DNA, propiciando melhor adesão do microrganismo à superfície do cateter, dificultando a remoção e contribuindo para a maior proteção dos microrganismos frente a ação de antimicrobianos.^{16,17}

Dessa forma, é urgente e indispensável localizar novos compostos para atuar frente aos microrganismos resistentes e biofilmes.^{18,19} O gênero *Handroanthus* compõe plantas de grande relevância no Brasil, como plantas nativas de diferentes biomas e com propriedades ainda não descobertas, podendo abrigar endófitos capazes de produzir compostos bioativos, uma temática que está iniciando e deve ser ainda muito explorada.²⁰

Assim, surgiu o interesse em analisar o potencial antimicrobiano de *Handroanthus ochraceus* (ipê amarelo), uma espécie arbórea pouco explorada cientificamente em suas propriedades e comunidade de fungos endofíticos associada. A planta foi decretada em 27 de junho de 1961 como flor símbolo do Brasil, nativa do país.²¹

H. ochraceus é uma árvore de cerca de 15 metros de altura, que apresenta tronco reto ou moderadamente curvo, casca externa grisácea-grossa resistentes com fissuras profundas, copa alongada da base, raízes vigorosas e profundas, folhas verde-escuras, frutos de capsula bivalvar, secos, do tipo síliqua, flores grandes de coloração amarelo-ouro, medido cerca de 8x15 cm. Está presente nos biomas Mata Atlântica e Cerrado, podendo ser encontrada nas regiões Sudeste (Minas Gerais, São Paulo, Rio de Janeiro), Sul (Paraná, Santa Catarina, Rio Grande do Sul), além da Bahia, Maranhão e Amapá.²²

Assim, o objetivo do presente estudo é avaliar a ação antimicrobiana e antibiofilme *in vitro* de compostos produzidos por fungos endofíticos isolados de flores de *Handroanthus ochraceus*, contra as bactérias patogênicas *Escherichia coli* ATCC 25922 e *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.

MATERIAIS E MÉTODOS

Coleta do material

Foram coletadas flores de *Handroanthus ochraceus* (ipê-amarelo) (planta jovem de dois anos) no município de Toledo, na região oeste do Estado do Paraná, Brasil, no ano de 2019, sazonalidade inverno, com as seguintes coordenadas geográficas latitude 24.735 S e longitude 53.751 O. Estas foram transportadas para o laboratório de Microbiologia da Universidade Federal do Paraná – Campus Toledo. A pesquisa foi cadastrada no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (SISGEN). A espécie é pertencente ao reino Plantae, divisão Magnoliophyta, Classe Magnoliopsida, Subclasse Asteridae, ordem Lamiales, família Bignoniaceae, gênero *Handroanthus*, espécie *H. ochraceus*.

Processamento do material

As flores foram lavadas em água corrente e posteriormente submetidas ao processo de desinfecção superficial.²³ As flores foram submersas em solução Tween 80 a 0,01% para retirar a tensão superficial e enxaguadas com a água destilada autoclavada. Em seguida, foram levadas à câmara de fluxo laminar e desinfestadas com solução de álcool a 70%, sendo imersas por um minuto, sob agitação vigorosa e constante.

Após este procedimento inicial foi descartado a parte líquida, restando apenas as flores. O processo foi repetido utilizando solução de hipoclorito de sódio 3% durante três minutos e solução de álcool a 70% por mais 30 segundos e enxágue de duas vezes com água destilada autoclavada. Uma pequena alíquota de 100 µL da água do último enxágue foi inoculada em placa de Petri como forma de controle negativo.

Obtenção de fungos endofíticos e metabólitos secundários

Flores foram cortadas em fragmentos de 5 mm, distribuídas em placas com Ágar Batata Dextrose (BDA) e incubadas por $25\pm 2^{\circ}\text{C}$. Os fungos que tiveram crescimento foram nomeados numericamente e listados de acordo com suas características morfológicas.

Para a obtenção de metabólitos secundários, foi utilizada fermentação submersa, na qual os fungos foram incubados em erlenmeyers contendo meio Batata Dextrose (BD) a $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ por nove dias em agitador orbital com 160 rpm. O meio fermentado foi coletado, centrifugado a 3.600 rpm por 10 minutos e filtrado em papel filtro.²⁴ A fase aquosa foi separada em três partes, a fim de se obter polaridades diferentes: uma parte para ser testada pura (meio aquoso), outra para ser obtida em acetato de etila e outra em clorofórmio. A escolha dos solventes foi baseada no grau de polaridade, do mais ao menos polar, respectivamente.

Para se extrair os compostos solúveis em acetato de etila e clorofórmio, o meio fermentado foi inserido em um funil de separação com o mesmo volume de solvente. O funil foi agitado e as fases foram separadas. A extração foi repetida mais duas vezes. O resultante da extração foi então concentrado em evaporador rotativo a 50°C até se obter cerca de 1 mL de composto e estocado a 4°C .

Avaliação da ação antimicrobiana

A ação antimicrobiana dos metabólitos fúngicos foi testada utilizando ensaios biológicos quantitativos, em triplicata, contra dois dos microrganismos mais frequentemente associados as infecções por cateteres vesicais de demora: *E. coli* ATCC 25922 e *P. aeruginosa* ATCC 27853.

Determinação Concentração Inibitória Mínima (CIM)

O teste para determinar qual a menor concentração do metabólito fúngico capaz de impedir o crescimento microbiano foi realizado em microplacas de 96 poços, utilizando a técnica de microdiluição em caldo²⁵, realizado em triplicata em dois experimentos independentes.

Foram preparadas suspensões bacterianas em caldo Müller-Hinton (MH) com 24 horas de incubação a $36\pm 2^{\circ}\text{C}$ e a concentração ajustada para $1,5\times 10^8$ células.mL⁻¹ (diluição 1:10).

Cada poço da microplaca foi inoculado com 150 µL de MH, 150 µL do metabólito fúngico, na concentração de 50%, sendo realizado diluições seriadas de 150 µL até a concentração final de 5%, ao final, acrescidos 15 µL da suspensão bacteriana (5×10^5 células.mL⁻¹). Foram realizados controles negativos, somente com meio de cultura, outro com os solventes de cada fração, bem como um controle positivo, sem a adição do metabólito, empregando o antibiótico Ciprofloxacina 500mg dissolvido em 10ml de água destilada. As placas foram incubadas por 24 horas a $37\pm 2^{\circ}\text{C}$.

Posteriormente, a placas foram avaliadas pela turbidez visual e adição de 20 µL do Cloreto de Trifenil Tetrazólio (0,125%) em cada poço. O número de células viáveis está linearmente relacionado à atividade bacteriana, que é refletida pela conversão do tetrazólio de cor amarela para vermelha.²⁶

Adicionalmente, para se avaliar a Concentração Bactericida Mínima (CBM) de cada extrato metabólito, uma alíquota de 100 µL do poço que não apresentou crescimento visualmente (sem adição do corante) foi inoculada em placa de Petri contendo meio MH e incubada por 24 horas a $37\pm 2^{\circ}\text{C}$. A menor concentração que causou a morte em 99,9% ou mais do inóculo bacteriano, foi nomeada de efeito bactericida, sendo as demais inibições em concentrações inferiores de efeito bacteriostático.

Determinação da Concentração Mínima de Inibição de Formação de Biofilme (MBIFC)

Foram utilizadas placas de 96 poços com fundo plano, realizando ensaios de microdiluição em poço, em triplicata para cada microplaca utilizada.

Cateteres urinários de silicone e látex (fragmentos de 1 cm) foram usados para a formação de biofilme, sendo avaliado o potencial dos compostos extraídos de fungos endofíticos antes da presença dos biofilmes. A metodologia foi desenvolvida pelos autores, adaptando a metodologia de erradicação de biofilmes já formados.²⁷

Para preparação do inóculo bacteriano, a densidade de suspensão foi padronizada por comparação com a escala 1,0 de McFarland ($3,0 \times 10^8$ UFC. mL⁻¹), sendo diluída a 1:30 em meio de crescimento novo, alcançando $1,0\times 10^7$ UFC.mL⁻¹. Após, adicionou-se 100 µL da suspensão em cada um dos 96 poços de microdiluição, 100 µL do metabólito fúngico, na concentração obtida na CIM e três diluições inferiores e o fragmento do cateter urinário. Foram realizados controle negativo contendo apenas meio de cultura e o cateter, bem como controles

positivos com a suspensão bacteriana e o cateter. As placas foram cobertas por papel alumínio e incubadas em B.O.D. por 5 dias a $36\pm 2^{\circ}\text{C}$.

A formação de biofilme foi confirmada pela coloração dos cateteres em uma nova placa contendo 200 μL de safranina 0,1% durante 30 minutos. Após a coloração foram classificados visualmente e em associação a um microscópio óptico a atividade inibitória dos fungos endofíticos na formação inicial do biofilme.

Determinação da Concentração Mínima de Erradicação de Biofilme (MBEC)

As bactérias a serem testadas foram inoculados em caldo MH, com densidade padronizada a 0,5 na escala McFarland (10^8 UFC.mL^{-1}), sendo incubados por 24 horas a 37°C .

Para os ensaios, foram formados biofilmes em fragmentos de 1 cm de cateteres urinários, adicionando o dispositivo médico em 200 μL do inóculo bacteriano em placas de 96 poços, sendo incubados por 5 dias a $36\pm 2^{\circ}\text{C}$. Posteriormente, os cateteres foram transferidos para uma nova placa, contendo caldo de MH, incubando a 37°C overnight. Os cateteres foram removidos e enxaguados em Tampão de Fosfato (PBS), com Ph ajustado para $7,2\pm 0,2$.

Uma nova placa foi necessária para transferir os cateteres, sendo preenchida com 90 μL de caldo MH e 90 μL dos compostos extraídos dos fungos endofíticos, na concentração obtida na CIM e três diluições inferiores. A placa foi imersa em banho ultrassônico, durante 3 minutos, incubando a 37°C por 24 horas.

Realizou-se controle positivo com linhagem ATCC formadora de biofilme e controle negativo utilizando caldo não inoculado. Após esse processo, foi avaliado a atividade antibiofilme pela turbidez nos poços da placa e pela aplicação do corante tetrazólio, comparando com controle positivo e negativo.²⁷

Microscopia

Foram observadas por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) os corpos de prova de cateter, analisando a estrutura dos biofilmes na ausência e na presença dos metabólitos fúngicos testados, comparando com os controles. Inicialmente, foi realizado um preparo em solução de formaldeído, deixando os cateteres imersos por 30 minutos. Em seguida, foi realizada uma sequência de desidratação com etanol 50%, 70%, 80%, 90% e 95%, deixando as amostras por 30 minutos em cada uma das concentrações.²⁸ Estas foram mantidas em álcool etílico absoluto até serem levadas à Universidade Federal do Paraná- Campus Palotina, onde foram analisadas.

As amostras foram submetidas a pressurização com CO₂ modelo Leica EM CPD300. Após essa etapa, foram metalizadas com partículas de ouro, em aparelho Denton Vacuum. Logo após, foram analisadas em microscópio eletrônico, modelo Tescan Vega 3, com aumento de 50.000X.

Técnica de identificação de fungos

Para a identificação dos fungos endofíticos isolados de *H. ochraceus*, as colônias foram semeadas em meio BDA, incubadas a temperatura de 25±2⁰C e analisadas quanto ao aspecto das (formato do micélio, cor, tempo de crescimento, bordas, entre outros). Para identificação de estruturas microscópicas foi utilizada a técnica do microcultivo em placa.²⁹ As placas foram incubadas a 25±2⁰C por sete dias. Após este período, as estruturas fúngicas foram coradas com lactofenol, azul de algodão e visualizadas em microscópio óptico (NIKON).

Os microrganismos submetidos às técnicas de análise macroscópica e citológica foram confrontados com as chaves de classificação de fungos, observando-se as estruturas dos conidióforos, coloração da colônia e características das hifas.

Determinação de compostos

Os metabólitos fúngicos que apresentaram atividade antimicrobiana e/ou antibiofilme foram submetidos à triagem química preliminar, em triplicata, para detecção da classe dos compostos fenólicos e flavonoides.

O conteúdo total de compostos fenólicos foi determinado usando reagente de Folin-Ciocalteu e 750µL de metabólito de fungos endofíticos isolados de *H. ochraceus*. A absorbância foi medida a 725 nm em espectrofotômetro UV-VIS.^{30,31} O teor total foi determinado usando a curva de calibração com ácido gálico e expresso em mg equivalente de ácido gálico (mg EAG/L).

O conteúdo de flavonoides foi determinado usando métodos descritos^{31,32}, utilizando 750µL de metabólito de fungos endofíticos isolados de *H. ochraceus*. A absorbância foi medida em 425 nm no espectrofotômetro UV-VIS em temperatura ambiente. O conteúdo total de flavonoides foi determinado usando a curva de calibração com quercetina e expresso em mg equivalente de quercetina (mg EQ/L).

Os valores obtidos foram submetidos a análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas pelo teste de Tukey (p<0,05), utilizando o software XLSTAT.

RESULTADOS

Foram isolados 56 fungos endofíticos de flores de *H. ochraceus*, nomeados por algarismos arábicos sequenciais, que foram purificados e armazenados. Destes, foram selecionados 17 (n) fungos aleatoriamente, sem distinção para serem testados frente a cepas de *E. coli* e *P. aeruginosa*, utilizando extrato aquoso e frações de clorofórmio e acetato de etila.

Os testes com extrato aquoso e no solvente clorofórmio não apresentaram efeito antibacteriano contra as duas cepas avaliadas na CIM, assim, foi dada sequência na pesquisa apenas com a fração de acetato de etila que apresentou atividade antimicrobiana e antibiofilme para nove (53%) isolados fúngicos. A Tabela 1 demonstra os resultados da CIM, CBM e ensaios antibiofilme (MBIFC e MBEC) dos metabólitos extraídos em acetato de etila contra a bactéria *E. coli* e *P. aeruginosa*.

Tabela 1: CIM, CBM e ensaios antibiofilme da fração de acetato de etila dos metabólitos de fungos endofíticos isolados de flores de *Handroanthus ochraceus* frente a *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*

Fungo	Bactéria	CIM (%)	CBM	MBIFC		MBEC	
				Látex	Silicone	Látex	Silicone
F1	<i>E. coli</i>	37,5%	Bacteriostático	-	+	+	+
F15	<i>E. coli</i>	50%	Bacteriostático	+	-	-	-
F16	<i>E. coli</i>	50%	Bacteriostático	+	+	+	+
F22	<i>E. coli</i>	50%	Bacteriostático	+	-	-	-
F22	<i>P. aeruginosa</i>	25%	Bacteriostático	+	+	-	-
F29	<i>P. aeruginosa</i>	25%	Bactericida	+	+	-	-
F34	<i>E. coli</i>	37,5%	Bacteriostático	+	-	-	-
F34	<i>P. aeruginosa</i>	25%	Bacteriostático	+	+	-	-
F36	<i>P. aeruginosa</i>	25%	Bacteriostático	+	+	-	-
F39	<i>E. coli</i>	50%	Bactericida	+	-	+	+
F39	<i>P. aeruginosa</i>	25%	Bactericida	+	+	-	+
F53	<i>P. aeruginosa</i>	25%	Bacteriostático	+	+	+	+

CIM: Concentração Inibitória Mínima. CBM: Concentração Bactericida Mínima. MBIFC: Concentração mínima de inibição de formação de biofilme. MBEC: Concentração mínima de erradicação de biofilme.
-: Não houve inibição do biofilme. +: Houve inibição do biofilme.

Dos 17 metabólitos fúngicos testados na fração de acetato de etila seis (35%) apresentaram resultados de inibição pela CIM para a bactéria *E. coli*, com concentrações entre

37,5% e 50%. Dentre estes, destacam-se os extratos dos fungos F1 e F34 que apresentaram a menor CIM e o F39 que foi o único que apresentou efeito bactericida.

Similarmente aos resultados obtidos para *E. coli*, seis (35%) dos extratos de fungos endofíticos apresentaram resultados de inibição pela CIM para a bactéria *P. aeruginosa*, porém todos em concentração de 25%. Dentre estes, destacam-se os extratos dos fungos F29 e F39 que apresentaram efeito bactericida. É relevante destacar que apenas três (17%) extratos conseguiram alcançar inibição associadamente para as duas bactérias, sendo o F22, F34, F39.

O controle positivo com antibiótico Ciprofloxacina na MIC, foi capaz de inibir o crescimento bacteriana nas duas cepas. O controle negativo testado indicou que foram seguidos protocolos de esterilidade durante experimentação, no qual não foram observados crescimento bacteriano.

Ao avaliar o efeito antibiofilme nos cateteres por meio dos ensaios MBIFC e MBEC é possível observar que para a cepa *E. coli* ATCC 25922 o extrato de F16 conseguiu impedir a formação e erradicar os biofilmes já formados em ambos os cateteres, independentemente do tipo de material. Adicionalmente, o extrato de F1 e F39, além de terem apresentado bom resultado no controle do microrganismo isolado, também apresentaram efeito para inibir a formação de biofilmes nos cateteres de látex ou silicone e erradicar os biofilmes nos dois tipos de cateteres. De forma geral para esta bactéria verifica-se que o efeito inibidor da formação do biofilme foi mais efetivo quando comparado a aplicação do extrato metabólito para erradicação do biofilme.

O efeito antibiofilme nos cateteres para a cepa *P. aeruginosa* ATCC 27853 também foi menos efetivo para erradicar biofilmes formados, sendo que todos foram capazes de impedir a formação de biofilme. É possível observar que o extrato de F53 conseguiu impedir a formação e erradicar os biofilmes já formados nos dois cateteres, independentemente do tipo de material. Adicionalmente, o extrato de F39, além de ter apresentado bom resultado no controle do microrganismo isolado, também apresentaram efeito para inibir a formação de biofilmes nos cateteres de látex e de silicone e erradicar os biofilmes nos cateteres de silicone.

A metodologia desenvolvida para a avaliação da inibição da formação dos biofilmes, pela adaptação da metodologia já existente de MBEC, foi eficiente para determinar a capacidade dos extratos metabólitos dos fungos endofíticos em evitar a formação dos biofilmes. Apesar de não ter sido validada, não foi observado diferença estatística entre as replicatas realizadas para a avaliação, demonstrando que o método é reprodutível.

Ressalta-se que a concentração já estabelecida na CIM, foi a mesma também obtida nos ensaios antibiofilme, sendo as concentrações inferiores testadas não relacionadas a atividade de inibição.

A Figura 1 demonstra os resultados observados pela microscopia eletrônica de varredura, da formação ou inibição dos biofilmes na superfície de cateteres de silicone. A observação em MEV dos biofilmes nos cateteres de látex foi dificultada devido a expansão do material durante o processo de pressurização para metalização com partículas de ouro, no qual os cateteres foram expandidos e apresentaram dificuldade pa observação detalhada dos biofilmes.

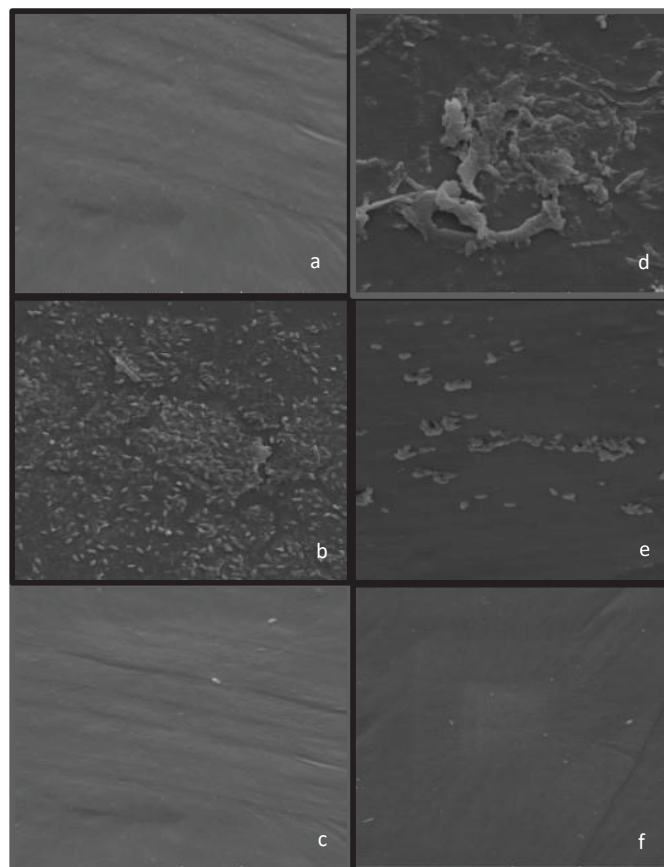


Figura 1 Visualização da inibição bacteriana e atividade antibiofilme frente a *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa* na Microscopia Eletrônica de Varredura, com radiação emitida por Elétrons Secundários (SE) em cateteres de silicone. Em a: Controle negativo b: Controle positivo *E. coli*; c: Inibição completa por F.39 frente a *E. coli*; d: Controle positivo *P. aeruginosa*; e: Inibição parcial por F.34 frente a *P. aeruginosa*; f: Inibição completa por F.53 frente a *P. aeruginosa*.

Foi possível visualizar nos cateteres de silicone que a quantidade de células bacterianas presentes, bem como a estruturação da matriz extracelular dos biofilmes foi afetada pela presença dos metabólitos dos fungos endofíticos, reduzindo sua densidade. Os controles

positivos (cateter + suspensão bacteriana formadora de biofilme) e negativos (cateter + meio de cultura) facilitaram a comparação da atividade inibitória e antibiofilme.

Dos extratos metabólitos dos fungos testados, nove apresentaram atividade antimicrobiana e então foram submetidos a técnica de identificação clássica. Destes, foi possível identificar em nível de gênero cinco fungos, sendo: F22 – *Cladosporium* sp., F29 – *Penicillium* sp., F34- *Aspergillus* sp., F36- *Phomopsis* sp. e F53- *Trichoderma* sp., todos pertencentes ao filo *Ascomycota*. Os demais fungos não caracterizados serão posteriormente identificados por sequenciamento.

Para a análise de compostos fenólicos utilizando ácido gálico para a construção da curva padrão, foi obtida a equação: $y=0,0063x-0,0031$, com $R^2= 0,9996$. Para a análise de flavonoides utilizando quercetina para a construção da curva padrão foi obtida a equação: $y=0,0069x-0,0111$, com $R^2= 0,9929$. A quantidade de compostos fenólicos totais e dos flavonoides presentes nos metabólitos extraídos com acetato de etila estão apresentados na Figura 2.

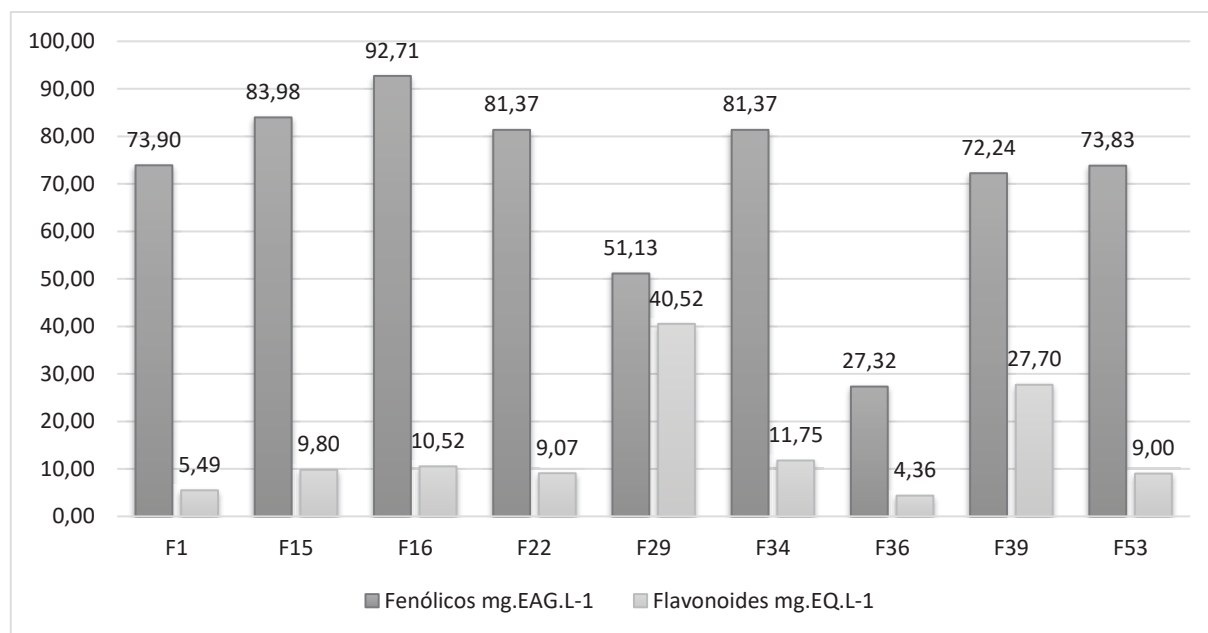


Figura 2 Concentração de compostos fenólicos e flavonoides presentes nos metabólitos secundários extraídos com acetato de etila dos fungos endofíticos isolados de *Handroanthus ochraceus*.

Em relação aos compostos fenólicos totais, a análise de variância (ANOVA) e o teste Tukey ($p<0,05$) demonstraram diferença significativa entre os extratos dos fungos F16 e F36. Com os maiores e menores valores, respectivamente. Os coeficientes de variação ficaram entre 0,14 e 8,87% para compostos fenólicos.

Para os flavonoides não houve diferença estatística significativa entre os extratos, sendo o valor mais elevado apresentado por F29 e o menor, assim como para fenólicos totais, por F36. Os coeficientes de variação ficaram entre 0,26 e 10%, com um CV de 26% para F22 para flavonoides. Foi possível verificar que F29 apresentou o maior índice de flavonoides para o total de compostos fenólicos, correspondendo a 79,2%.

DISCUSSÃO

Entre as inúmeras famílias de plantas existentes, destaca-se a Bignoniaceae, grupo que abrange os ipês e que tem efeitos descritos como antitumorais, antifúngicos, anti-inflamatório e antimicrobiano, com ação potencial para as ciências farmacêuticas e biotecnologia.³³ Nesse sentido, foi escolhido para presente pesquisa a planta *H. ochraceus* por ser a flor símbolo do Brasil, com propriedades antimicrobianas ainda pouco exploradas.

Pesquisas realizadas anteriormente avaliaram plantas pertencentes ao gênero *Handroanthus*, com ação positiva frente microrganismos patogênicos Gram-positivos,^{34,35} Gram-negativos e leveduras, em que a presença de compostos ativos também podem ser atribuídas aos endófitos presentes nesta plantas.

Essa afirmativa explica a inibição bacteriana ocasionada pelos metabólitos secundários extraídos dos fungos endofíticos desta planta no crescimento de *E. coli* e *P. aeruginosa*. De modo geral, extratos fúngicos de *H. ochraceus* foram capazes de inibir cepas Gram-negativas, o que chama a atenção e é um resultado relevante, tendo em vista resultados de outras pesquisas envolvendo o gênero *Handroanthus* em que não apresentaram resultados promissores,^{36,37} e a patogenicidade bacteriana que dificulta o controle de ambas as bactérias.

Em relação a concentração estabelecida pela CIM, no qual na pesquisa foi relativamente alta variando entre 25%, 37,5% e 50%, esclarece-se a possibilidade de existência da ligação dos compostos entre si. Em condições de menor concentração do extrato há expressão de melhores efeitos, devido a maior concentração dos metabólitos em menor quantidade de solvente, permitindo também maior interação entre estes.³⁸ Isso explica a não inibição de alguns fungos endofíticos, pois conforme já descrito, dos 17 fungos testados, nove (~53%) tiveram atividade antibacteriana frente a *E. coli* e *P. aeruginosa*.

Quanto aos achados relacionados a formação de biofilmes, é relevante destacar que bactérias em forma planctônica são mais susceptíveis a predação, dessecação e ação de compostos químicos quando comparadas ao biofilme maduro, uma vez que as do biofilme são fenotipicamente divergentes, podendo estar em estágios diferentes de maturação e divisão

celular.^{17,39} Adicionalmente, é importante frisar que os biofilmes dificultam a ação de antimicrobianos pela matriz do glicocálice capaz de interromper a ação dos antimicrobianos, preservar e proteger a extensão externa do biofilme. Somado a isso, há alta atividade enzimática e metabólica, limitação da difusão, dificuldades de comunicação entre antibióticos e matriz dos biofilmes, modificações genéticas e arranjo da membrana.⁴⁰

Observou-se neste trabalho que a inibição em biofilme maduro foi bem mais reduzida quando comparada ao biofilme em formação, em virtude de que quando formados expressam intensa atividade metabólica, minimizando a comunicação entre a matriz do biofilme, o que reforça o apresentado pelos autores da resistência e limitação da atividade antimicrobiana.

Possivelmente as inibições observadas na pesquisa podem ter ligação com o *quorum sensing*, que é um sistema de comunicação e controle populacional muito complexo apresentado pelos biofilmes, haja vista que antimicrobianos que sejam capazes de atuar nesse processo de comunicação celular e crescimento do biofilme, interferem diretamente no comportamento coletivo, mecanismos de virulência e na destruição dos biofilmes.^{41,42}

Conforme descrito,^{43,44} *E. coli* é um microrganismo de relevância na formação de biofilmes, sendo considerado um forte produtor de biofilme, de crescimento rápido. Enquanto *P. aeruginosa* exibe propriedades de crescimento lento associadas a forte formação de biofilme e persistência.⁴⁵ Este fator foi observado no processo de formação dos biofilmes de *E. coli*, em que foi muito mais rápido quando comparado ao de *P. aeruginosa*. Na análise de MEV foi possível verificar que biofilmes isolados de *E. coli* eram maiores e mais estruturados, com o mesmo tempo de formação do que os de *P. aeruginosa*.

O material do cateter urinário é outro fator listado em pesquisas, que influencia na potencialidade da infecção de trato urinário. Os cateteres de látex apresentam alta propensão à formação de biofilmes, devido à composição favorável de superfícies irregulares hidrofóbicas e hidrofílicas que permitem a fixação e colonização por vários microrganismos, além da baixa resistência a radiação ultravioleta e possíveis reações alérgicas.⁴⁶

Os cateteres de silicone são considerados mais resistentes a incrustação em comparação aos de látex, pois reduzem a inflamação uretral e fixação bacteriana, especialmente quando revestido por algum composto antimicrobiano.⁴⁷ Nota-se quanto aos ensaios de inibição utilizando os extratos, que ambos os cateteres apresentaram resultados praticamente equivalentes de inibição, todavia, considera-se que sem a presença de antimicrobianos os cateteres de látex favorecem a colonização bacteriana, especialmente pela superfície mais irregular favorecer a adesão e instalação de biofilme. Apesar disso, os cateteres de látex ainda

são os mais utilizados devido ao custo mais reduzido em relação aos cateteres de silicone e poliuretano.

Quanto ao efeito antimicrobiano, dos nove extratos de fungos endofíticos com resultados promissores, apenas dois alcançaram resultados bactericidas, F29 e F39, provocando a morte das bactérias e não somente impedindo seu crescimento⁴⁸. Um fator que pode explicar essa ação bactericida é a presença de flavonoides, já que esses foram os dois extratos, que apesar de não apresentarem os maiores valores de compostos fenólicos totais, apresentaram a maior concentração de flavonoides. Destaca-se ainda entre os dois, o F39 em que foi observado inibição em ambos os testes de biofilme, cateteres e bactérias. Em contrapartida o extrato de F36 não apresentou atividade contra *E. coli*, apresentou apenas potencial para evitar a formação dos biofilmes de *P. aeruginosa*, não atuando na erradicação dos mesmos e foi o extrato que apresentou a menor concentração de compostos fenólicos totais e de flavonoides.

Em se tratando da identificação fúngica, pesquisa anterior⁷ identificou endofíticos pertencentes aos gêneros *Penicillium*, *Aspergillus* e *Trichoderma*, produtores de moléculas com potencial antimicrobiano contra cepas bacterianas e fúngicas, isolados também extraídos na atual pesquisa pertencentes ao F29, F34, F53, respectivamente.

Penicillium sp. já apresenta atividade biológica descrita na literatura, tais como citotóxica, antibacteriana, antifúngica, antiviral e antiinflamatória,⁴⁹ originando caminhos para o desenvolvimento de novos produtos e fármacos.⁵⁰ Assim como, o endofítico *Trichoderma*, em que foi isolado também por acetato de etila,⁵¹ com atividade antimicrobiana.⁵²

Quanto ao filo, todos os isolados da pesquisa são oriundos do *Ascomycota*, o que reforça a afirmativa de que endofíticos com ação antibiótica são pertencentes a esse filo.⁵³

Sobretudo, fungos são conhecidos por seu papel ambiental, versatilidade na obtenção de metabólitos secundários, incluindo compostos bioativos e facilidade na reprodutibilidade de resultados.^{54,55} Estima-se que 80% dos fungos endofíticos produzem metabólitos ativos, a depender de suas condições ambientais como fermentação, temperatura, pH e nutrientes, desempenhando inúmeras atividades biológicas.⁵⁶

Para alcançar a diversidade de compostos naturais de fungos endofíticos, o solvente é um dos parâmetros primordiais.⁵⁷ Conforme observado, as frações com acetato de etila foram mais promissoras nos ensaios de inibição quando comparado a água (polar) e o solvente clorofórmio (apolar). O solvente em questão interagiu na liberação de mais compostos ativos da classe de fenólicos- flavonoides, determinado pelo emprego do solvente acetato de etila.⁵⁸

Os flavonoides constituem a família mais ampla dentro da classe dos compostos fenólicos, as quais tem sido bastante representativos em atividades antibacterianas, por formar

complexos com as proteínas solúveis e extracelulares da parede bacteriana.^{35,59} Estão listados entre os potenciais antimicrobianos, pois são capazes de inibir o crescimento bacteriano por meio da alteração da permeabilidade de membrana e parede celular, inibição da síntese de ácidos nucleicos, neutralização dos fatores de virulência, inibição de urease, bem como pela atividade sinérgica com antibióticos,⁶⁰ o que explica a inibição encontrada em *E.coli* e *P. aeruginosa*.

A presença de metabólitos secundários em extratos de plantas já é uma atividade antibacteriana descrita, advinda da presença de terpenoides, fenóis,⁶¹ cumarinas, taninos, esteroides,⁶² e principalmente flavonoides.⁶³

Endofíticos contém derivados de benzopirranonas, ácidos fenólicos, alcalóides, flavonóides, terpenóides, xantonas, quinonas, esteróides, tetralonas, xantonas e outros, desempenhando funções relevantes na natureza.⁶⁴ Destacando-se os alcaloides, terpenoides, esteroides, quinonas, isocumarinas, lignanas, fenilpropanoides, fenóis e lactonas.⁶⁵

Há diversos fitoquímicos que podem ser encontrados dentre os quinones, iridoides, derivados de ácido fenólico, propanoides fenil, etanoides fenil, lignans, neolignans, isocoumarins, flavonoides e esteróis.⁶⁶

Em se tratando dos metabólitos secundários, na presente pesquisa foram encontrados em média 70,87 mgEAG.L⁻¹ de polifenóis e 14,25 mgEQ.L⁻¹ de flavonoides extraídos de fungos endofíticos de *H. ochraceus*, valor este que foi capaz de inibir bactérias Gram-negativas, como *E. coli* e *P. aeruginosa*.

Corroborando outras pesquisas determinaram quantitativamente polifenóis totais de 24,937mg/g para extratos de Ipê Roxo,⁶⁷ 4,01 mg/g de extratos de *H. impetiginosus*,⁶⁸ 5.330 mg/g; de *H. obscurus*,⁶⁹ e 826,66 µg/mL de lapachol em *H. serratifolius*.⁷⁰ O isolado F34-*Aspergillus* sp. da presente pesquisa atingiu 81,37 mgEAG.L⁻¹ de polifenóis, o mesmo gênero variou entre 48,0 ± 4,32 e 134,62±3,89 mgEAG.g.⁷¹ Ressalta-se que há dificuldade para comparar e relacionar os resultados dos metabólitos secundários, pois não se tem uma padronização nas unidades de medida e caracterização do quanto determinado quantitativo significa, ou seja, não existem valores preconizados para considerar um metabólito como “bom” ou “ruim”.

Para os extratos dos fungos endofíticos que apresentaram baixas concentrações de flavonoides, mas apresentaram atividade antimicrobiana, pode-se pressupor que os efeitos antimicrobianos devem ser decorrentes de outros compostos presentes na classe dos fenólicos e que ainda devem ser explorados.

CONCLUSÃO

Fungos endofíticos extraídos de *H. ochraceus* na fração de acetato de etila tiveram atividade antibacteriana e antibiofilme, frente a *E. coli* e *P. aeruginosa*, especialmente inibindo biofilmes em formação. A presença de metabólitos secundários em extratos de plantas já é uma atividade antibacteriana descrita na literatura, em que muitos dos achados corroboraram com resultados já existentes.

A metodologia aplicada e inserção de novas adaptações foi coerente para alcançar os resultados almejados. Existem limitações na pesquisa, como a avaliação dos metabólitos apenas com bactérias gram-negativas, a classificação de alguns fungos endofíticos e o resultado inesperado do cateter de látex na preparação da análise da microscopia eletrônica de varredura.

Sobretudo, pode-se sugerir que os compostos podem ser uma potente alternativa ao tratamento das ITU-AC, no entanto, há muito o que se explorar para desenvolvimento de produtos biotecnológicos utilizando determinados compostos, incluindo o seguimento de impregnação de cateteres urinários, uma vez que os resultados da presente pesquisa são preliminares e necessitam de estudos complementares.

REFERÊNCIAS

1. Wani ZA, Ashraf N, Mohiuddin T, Hassan SRU. **Plant-endophyte 20 symbiosis, an ecological perspective**. Applied Microbiology and Biotechnology. 2015; **99**(7):2955–2965.
2. Corrêa AJC. Contribuição do conhecimento popular para a descoberta de novos antimicrobiano. 157 f. Tese [Doutorado]. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. Universidade Federal de Pernambuco. 2018.
3. Astolfi Filho S, Silva CGN, Bigi MFMA. **Bioprospecção e biotecnologia**. Parc. Estrat. 2014; **19**(38):45-80.
4. Freitas STF, Souza MB, Teodoro LO, Goulart MMP, Pinto TFE, Azevedo MA et al. **Aspectos taxonômicos da bioprospecção no brasil: tendência científica**. Oecologia Australis. 2020; **24**(4):770-780.
5. Florindo RHS. Bioprospecção de metabólitos secundários bioativos produzidos por fungos endofíticos associados à *Piper* sp. coletada no Parque Estadual do Rio Doce, Minas Gerais. Ouro Preto. Dissertação [Mestrado em Biotecnologia] - Universidade Federal de Ouro Preto; 2019.
6. Adeleke BS, Babalola OO. **Pharmacological Potential of Fungal Endophytes Associated with Medicinal Plants: A Review**. J. Fungi. 2021; **7**(147).

6. Moura SST. Avaliação da atividade antimicrobiana de fungos endofíticos isolados de plantas no Brasil contra patógenos humanos. Florianópolis. Dissertação [Mestrado em Biotecnologia e Biociência] - Universidade Federal de Santa Catarina; 2020.
8. Campana R, Biondo F, Mastrotto F, Baffone W, Casettari L. **Chitosans as new tools against biofilms formation on the surface of silicone urinary catheters.** International Journal of Biological Macromolecules. 2018; **118**: 2193-2200.
9. Flores-Mireles AL, Hreha TN, Hunstand DA. **Pathophysiology, Treatment, and Prevention of Catheter-Associated Urinary Tract Infection.** Top Spinal Cord Inj Rehabil. 2019; **25** (3):228–240.
10. Anvisa. Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária Medidas de Prevenção de Infecção Relacionada à Assistência à Saúde. Brasília: Anvisa, 2017.
11. Raz NE, Babitch T, Shaw E, Addy I, Wiegand I, Vank C et al. **Risk factors for treatment failure and mortality among hospitalized patients with complicated urinary tract infection: a multicenter retrospective cohort study (RESCUING Study Group).** Clinical Infectious Diseases. 2019; **68**(1):29-36.
12. Ferreira JLL, Otero JÁ, Gonzalez LG, Lamazares LN, Blanco AA, Sanjurjo JRB et al. ***Pseudomonas aeruginosa* urinary tract infections in hospitalized patients: Mortality and prognostic factors.** PLoS ONE. 2017; **12** (5): e0178178.
13. Conover MS, Hadjifrangiskou M, Palermo JJ, Hibbing ME, Dodson KW, Hultgren SJ. **Metabolic requirements of *Escherichia coli* in intracellular bacterial communities during urinary tract infection pathogenesis.** mBio. 2016; **7**(2): e00104-16.
14. Anjum S, Singh S, Benedicte L, Roger P, Panigrahi M, Gupta B. **Biomodification Strategies for the Development of Antimicrobial Urinary Catheters: Overview and Advances.** Glob Chall. 2017; **2**(1):1700068.
15. Zarza VMP, Mordani SM, Maldonado AM, Hernández DA, Georgina SGS, López RV. ***Pseudomonas aeruginosa*: patogenicidad y resistencia antimicrobiana en la infección urinaria.** Rev Chilena Infectol. 2019; **36**(2):180-189.
16. Vega HGT, Ventura AB, Romero FC, Sauchelli FD, Acosta AP, Alcazar FJR et al. **Assessment of a multi-modal intervention for the prevention of catheter-associated urinary tract infections.** The Journal Healthcare Infection Society. 2016; **94**(2):175-181.
17. Beebout CJ, Eberly AR, Werby SH, Reasoner SA, Brannon JR, Shuvro D et al. **Respiratory heterogeneity shapes biofilm formation and host colonization in uropathogenic *Escherichia coli*.** mBio. 2019; **10**: 02400-18.
18. Deepika VB, Murali TS, Satyamoorthy K. **Modulation of genetic clusters for synthesis of bioactive molecules in fungal endophytes: A review.** Microbiological Research. 2016; **182**:125-140.

19. Kukushkina EA, Hossain SI, Sportelli MC, Ditaranto N, Picca RA, Cioffi N. **Ag-Based Synergistic Antimicrobial Composites. A Critical Review.** *Nanomaterials*. 2021; **11**(7): 1687.
20. Gómez OC, Moreira DMB, Hernández ILC, Lemes R. **Antimicrobial activity improvement after fractionating organic extracts from *Lasiodiplodia* sp. Fermentation.** *Brazilian Journal of Development*. 2021. **7**(1):3795-3816.
21. Minas Gerais. A flor símbolo do Brasil. Prefeitura Municipal de Curral de Dentro, Minas Gerais, Brasil. 2022
22. Sistema de Informação sobre Biodiversidade Brasileira. *Handroanthus ochraceus* (Cham.) Mattos. Catálogo Taxonômico da Fauna do Brasil e Lista da Flora do Brasil. SiBBR.2020.
23. Araújo WL, Lacava PT, Marco J, Lima AOS, Sobral JK, Azevedo JL et al. Guia prático: isolamento e caracterização de microrganismos endofíticos. Departamento de Genética. Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”. Piracicaba: CALQ, 2010.
24. Bernardi-Wenzel J, Garcia, A, Azevedo JL, Pamphile JA. **Molecular characterization by amplified ribosomal DNA restriction analysis and antimicrobial potential of endophytic fungi isolated from *Luehea divaricata* (Malvaceae) against plant pathogenic fungi and pathogenic bacteria.** *Genetics and Molecular Research*. 2013; **12**(4):5072-5084.
25. Necls. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically. 6. ed., Pennsylvania - USA, 2003.
26. Gavani B, Dijhari A, Kottegoda N, Ratnaweera DR, Weerasekera MM. **Reduced Crystalline Biofilm Formation on Superhydrophobic Silicone Urinary Catheter Materials.** *ACS Omega*. 2021; **4**(17):11488–11496.
27. Mulla S, Kumar A, Rajdev S. **Comparison of MIC with MBEC Assay for in Vitro Antimicrobial Susceptibility Testing in Biofilm Forming Clinical Bacterial Isolates.** *Advances in Microbiology*. 2016; **6**(2):73-78.
28. Asahi Y, Miura J, Tsuda T, Kuwabata S, Noiri Y, Sakata T et al. **Simple observation of *Streptococcus mutans* biofilm by scanning electron microscopy using ionic liquids.** *AMB Express*. 2015; **5**(6).
29. Kern ME, Blevins KS. Micologia médica: Texto e atlas. Premier, São Paulo; 1999.
30. Singleton V, Rossi J. **Colorimetry of Total Phenolic Compounds with Phosphomolybdic-Phosphotungstic Acid Reagents.** *American Journal of Enology and Viticulture*. 1965; **16**:144-158.
31. Baroski M, Visentainer JV, Cottica SM, Morais DR. **Antioxidantes: princípios e métodos analíticos.** Appris ed. 2015; 141.
32. Woisky RG, Salatino A. **Analysis of Propolis: Some Parameters and Procedures for Chemical Quality Control.** *Journal of Apicultural Research*. 1998; **37**:99-105.

33. Silva AF, Salgueiro ACF, Rosa HS, Folmer V, Costa MT. Screening dos potenciais antioxidante e toxicológico do extrato hidroalcoólico da casca do ipê-amarelo *Tabebuia chrysotricha*. Universidade Federal de Pampa, campus Santana do livramento. Anais do 9º Salão Internacional De Ensino, Pesquisa e Extensão – SIEPE, 2017.
34. Torres CA, Nunez MB, Isla MI, Castro MP, Gonzalez AM, Zampini IA. **Antibacterial Activity of Tinctures from Tree leaves belonging to the Bignoniaceae family and their Synergistic Effect with Antibiotics.** Pharmacognosy Journal. 2015; 7(6):400-405.
35. Villareal S, Moreno S, Jaimez D, Fermín LR, Lucena M, Diaz L et al. **Actividad antibacteriana y antioxidante de extractos crudos de plantas pertenecientes a la familia bignoniaceae.** Acta bioclinica. 2017; 7(14).
36. Macedo LFC, Castanha EB, Correa AS, Oliveira DM, Pavan E, Martins DTO. **Antibacterial screening of medicinal plants in the Northern Araguaia microregion and evaluation of the action mechanism of the selected plant.** Brazilian Journal of Development. 2021; 7(1):7583-7592.
37. Alves HJ, Vieceli M, Alves C, Muniz GIB, Oliveira CLP, Feroldi M. et al. **Chitosan Depolymerization and Nanochitosan Production Using a Single Physical Procedure.** Journal of Polymers and the Environment. 2018; 26: 3913–3923.
38. Sousa JA. Avaliação da atividade antimicrobiana do extrato de ipê roxo (*Handroanthus impetiginosus*) em *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*. Brasília. Trabalho de Conclusão de Curso [Bacharel em Farmácia] - Universidade de Brasília. 2017.
39. Machul A, Mikolajczyk D, Futyra AR, Heczko PB, Strus M, Arruebo M et al. **Study on inhibitory activity of chitosan-based materials against biofilm producing Pseudomonas Aeruginosa strains.** Journal of Biomaterials Applications. 2015; 30(3):269–278.
40. Singh S, Singh SK, Chowdhury I, Singh R. **Understanding the mechanism of bacterial biofilms resistance to antimicrobial agents.** Open Microbiol J. 2017; 11:53–62.
41. Rabin N, Zheng Y, Temeng CO, Du Y, Bonsu E, Sintim HO. **Biofilm formation mechanisms and targets for developing antibiofilm agentes.** Future medicinal chemistry. 2015; 7(4).
42. Neves MLR, Nunes LE, Rocha WRV, Ximenes ECPA, Albuquerque MCPA. **Influência do quórum sensing na formação do biofilme por Pseudomonas aeruginosa.** Research, Society and Development. 2021; 10(2): e.33910212659.
43. Behzardi P, Urbán E, Gajdács M. **Association between Biofilm-Production and Antibiotic Resistance in Uropathogenic Escherichia coli (UPEC): An In Vitro Study.** Diseases. 2020; 8(2):17.
44. Neupane S, Pant ND, Khatiwada S, Chaudhary R, Banjara MR. **Correlation between biofilm formation and resistance toward different commonly used antibiotics along with extended spectrum beta lactamase production in uropathogenic Escherichia coli isolated from the patients suspected of urinary tract infections visiting Shree Birendra Hospital, Chhauni, Kathmandu, Nepal.** Antimicrobial Resistance and Infection Control. 2016; 5(5).

45. Mirani ZA, Fatima A, Urooj S, Aziz M, Khan MN, Abbas T. **Relationship of cell surface hydrophobicity with biofilm formation and growth rate: A study on *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*.** Iran J Basic Med Sci. 2018; 21(7):760–769.
46. Stickler DJ. **Clinical complications of urinary catheters caused by crystalline biofilms: something needs to be done.** J Intern Med. 2014; 276(2):120-129.
47. Verma A, Bhani D, Tomar V, Bachhiwal R, Yadav S. **Differences in Bacterial Colonization and Biofilm Formation Property of Uropathogens between the Two most Commonly used Indwelling Urinary Catheters.** J Clin Diagn Res. 2016; 10(6).
48. Pankey GA, Sabath LD. **Clinical Relevance of Bacteriostatic versus Bactericidal Mechanisms of Action in the Treatment of GramPositive Bacterial Infections.** Clinical Infectious Diseases. 2004; 38:864–870.
49. Mady MS, Haggag EG. **Review on Fungi of Genus *Penicillium* a Producers of Biologically Active Polyketides.** J. Adv. Pharm. Res. 2020; 4(2), 33-45.
50. Toghueo RMK, Boyom FF. **Endophytic *Penicillium* species and their agricultural, biotechnological, and pharmaceutical applications.** Biotech. 2020; 10:107.
51. Leylaie, S., Zafari, D. **Antiproliferative and Antimicrobial Activities of Secondary Metabolites and Phylogenetic Study of Endophytic *Trichoderma* Species From *Vinca* Plants.** Frente. Microbiol. 2018; 11, 9, 1484.
52. Santos SS, Augusto DG, Alves PAC, Pereira JS, Duarte LMB, Melo PC et al. ***Trichoderma asperelloides* ethanolic extracts efficiently inhibit *Staphylococcus* growth and biofilm formation.** PLoS ONE. 2018; 13(8): e0202828.
53. Klimova EM, Pena KR, Sánchez S. **Endophytes as sources of antibiotics.** Biochemical Pharmacology. 2017; 134:1-17.
54. Jia MA, Chen L, Xin HL, Zheng CJ, Rahman K, Han T et al **Friendly Relationship between Endophytic Fungi and Medicinal Plants: A Systematic Review.** Front. Microbiol. 2016; 7:906.
55. Lócio CJF. **Avaliação das atividades antibióticas e antiparasitária de metabólitos secundários de fungos endofíticos da *Anadenanthera macrocarpa*.** Paraíba. Monografia [Graduação em Engenharia de Biotecnologia e Bioprocessos] - Universidade Federal de Campina Grande; 2019.
56. Specian V, Orlandelli RC, Felber AC, Azevedo JL, Pamphile JA. **Metabólitos Secundários de Interesse Farmacêutico Produzidos por Fungos Endofíticos.** Journal of Health sciences. 2015; 16(4):345-351.
57. Pandey A, Tripathi S. **Concept of standardization, extraction and pre phytochemical screening strategies for herbal drug.** Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry. 2014; 2(5):115-119.

58. Oliveira CF, Oliveira FF, Oliveira VB, Miguel OG, Miguel MD. **Quality control parameters of *Psychotria fractistipula* L.B. Sm., Klein & Delprete (Rubiaceae): loss on drying, totalash and phytochemical screening.** Visão acadêmica. 2014; **15**(4).
59. Braga NSM, Tenório AG, Silva CBV, Oliveira ER, Pires LLS, Santo AF. **Antibacterial Action and Phenolic Composition of the Essential Oil of the Fruits of *Schinus terebinthifolius* Raddi Against Multidrug-Resistant Pathogens.** Rev. Virtual Quim. 2020; **12**(5):1057-1065.
60. Silva WB, Sobral NOB, Evangelista DR, Marson PG. **Infecção de trato urinário: Perfil etiológico e de sensibilidade aos antimicrobianos de uroculturas de pacientes ambulatoriais e hospitalizados na cidade de Palmas-TO.** Revista Cereus. 2020; **12**(4):13-24.
61. Torres CA, Zampini IA, Nunez MB, Isla MI, Castro MP, Gonzalez AM. **In vitro antimicrobial activity of 20 selected climber species from the Bignoniaceae Family.** Formerly Natural Product Letters. 2013; **27**(22): 2144-2148.
62. Morais MG, Oliveira Junior AS, Aguiar ELCC, Ferreira MVG, Martins MF, Oliveira PF. **Triagem fitoquímica e avaliação da atividade antibacteriana das flores de *Handroanthus impetiginosus*.** Revista Biodiversidade. 2020; **19**(2).
63. Ouyang J, Sun F, Feng W, Sun Y, Qiu X, Xiong L et al. **Quercetin is an effective inhibitor of quorum sensing, biofilm formation and virulence factors in *Pseudomonas aeruginosa*.** Journal of Applied Microbiology. 2016; **120**(4):966-974.
64. Hughes E. **Endophytic Fungi Diversity, Characterization and Biocontrol.** Microbiology Research Advances. 2016; 1-163.
65. Card SD, Hume DE, Roodi D, McGill CR, Millner JP, Johnson RD. **Beneficial endophytic microorganisms of *Brassica* – A review.** Biological Control. 2015; **90**:102-112.
66. Hamed ANE, Mahmoud BK, Samy MN, Kamel MS. **An extensive review on genus “*Tabebuia*”, family Bignoniaceae: Phytochemistry and biological activities (1967 to 2018).** Journal of Herbal Medicine. 2020; **24**:100410.
67. Mota BFO. Avaliação de diferentes processos extrativos utilizando ipê roxo (*Handroanthus impetiginosus*) (mart. Ex dc.) Mattos como droga vegetal. Brasília. Monografia [Bacharel em Farmácia] - Universidade de Brasília; 2018.
68. Felipe MEO. Caracterização físico-química de diferentes extratos de ipê roxo (*Handroanthus impetiginosus* Mart. Ex DC. Mattos – Bignoniaceae). Brasília. Trabalho de Conclusão de Curso [Graduação em Farmácia] - Universidade de Brasília; 2019.
69. Araújo IAC. Eficácia do lapachol extraído de *Handroanthus serratifolius* (bignoniaceae) para tratamento das leishmanioses. Uberlândia. Dissertação [Mestrado em Imunologia e parasitologia aplicada] - Universidade Federal de Uberlândia; 2017.

70. Sumarriva NLC. Capacidad antioxidante, polifenoles y efecto citotóxico en líneas celulares del extracto hidroalcohólico de *Handroanthus obscurus* (Bureau & K. Schum.) Mattos “*tahuari negro*”. Lima, Peru. Tese [Doutorado em Farmácia e Bioquímica] – Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Unidad de Posgrado; 2019.

71. Elkhoully HI, Hamed AA, El Hosainy AM, Ghareeb MA, Sidkey NM. **Bioactive Secondary Metabolite from Endophytic *Aspergillus tubenginses* ASH4 Isolated from *Hyoscyamus muticus*: Antimicrobial, Antibiofilm, Antioxidant and Anticancer Activity.** Phcogj.com Pharmacog J. 2021;**13**(2): 434-4.

APÊNDICE

NORMAS DAS REVISTAS CIENTÍFICAS NAS QUAIS OS ARTIGOS DOS CAPÍTULO I E II SERÃO SUBMETIDOS.

CAPÍTULO I:

Letters in Applied Microbiology

Letters in Applied Microbiology provides for the rapid publication of short, high quality papers in the broad field of applied microbiology, including environmental, food, agricultural, medical, pharmaceutical, veterinary, soil, antimicrobials, water and biodeterioration. Advances in rapid methodology are a particular feature. The Journal reflects developments in biotechnology in such fields as applied microbial genetics, immunodiagnosis and fermentation science.

Reviews

Review articles submitted to LAM will present a substantial survey with an adequate historical perspective of the literature on some facet of applied microbiology with a particular emphasis on translational research and impact. We would prefer to see a distillation of early and present work within the field to show progress and explain the present interest, relevance and significant changes and impact. The manuscript should not be simply a review of past work or be concentrated largely on unpublished results.

EDITORIAL PROCESS

New manuscripts sent to the Journal will be handled first by the Editorial Office who checks compliance with the guidelines to authors. The Chief Editor then assigns the manuscript to a handling Editor, who assesses the manuscript for suitability in the journal. At this screening stage a decision to reject or to go to full review is made. This step ensures a rapid rejection of unsuitable manuscripts for the journal, and authors should not expect full comments if papers are rejected at this stage. Manuscripts that go to full review are assigned a minimum of two reviewers. Following the return of two reports, the handling Editor provides a report to the Chief Editor, who takes the decision to accept, revise or reject the manuscript.

Revised manuscripts are directly handled by the Chief Editor who decides whether or not the manuscript should go back to the Editorial Office for additional comments from the reviewers. Following the return of a report from the handling Editor and reviewers, the Chief Editor makes the decision to accept, further revise or reject the manuscript.

Authors may be advised that sequential publication of numbered papers will not be permitted.

EDITORIAL POLICY

To ensure responsible publication practices, this Journal adheres to Wiley's [publication ethics policies](#), which include guidelines on handling suspected publication misconduct and complaints about the Journal. This Journal is a member of, and subscribes to the principles of, the [Committee on Publication Ethics](#).

Authorship

Qualification for authorship should comprise (1) substantial contribution to conception and design or the acquisition and analysis of data, (2) drafting or critically revising the manuscript, and (3) approval of the final submitted version. All authors must satisfy all three criteria, and all those who do satisfy this criteria must be included in the list of authors when the paper is submitted to the Journal. By submission of a manuscript to the Journal, all authors warrant that they have the authority to publish the material and that the paper, or one substantially the same,

has neither been published previously, nor is being considered for publication elsewhere. Submissions may be subject to testing for textual similarity to other published works via the CrossCheck software employed by the Journal.

Conflict of interest disclosure

Letters in Applied Microbiology requires that all authors disclose any potential sources of conflict of interest. Any interest or relationship, financial or otherwise, that might be perceived as influencing an author's objectivity is considered a potential source of conflict of interest. These must be disclosed when directly relevant or indirectly related to the work that the authors describe in their manuscript. Potential sources of conflict of interest include but are not limited to patent or stock ownership, membership of a company board of directors, membership of an advisory board or committee for a company, and consultancy for or receipt of speaker's fees from a company. The existence of a conflict of interest does not preclude publication in this journal.

If the authors have no conflict of interest to declare, they must also state this at submission. It is the responsibility of the corresponding author to review this policy with all authors and to collectively list in the cover letter to the Chief Editor, in the manuscript (in the Conflict of Interest section), and in the online submission system ALL pertinent commercial and other relationships.

Ethics of experimentation

The Journal will only accept manuscripts in which there is evidence of the ethical use of animals or harmful substances. The care and use of experimental animals must comply with all relevant local animal welfare laws, guidelines and policies, and a statement of such compliance should be provided upon submission. Where possible, alternative procedures that replace the use of animals, either partially or completely, for example *in vitro* biological systems, should be used. Where this is not possible, the minimum number of animals should be used and pain and suffering reduced, consistent with attaining the scientific objectives of the study. All reasonable steps must be taken to ensure the humane treatment of animals, so as to minimize discomfort, distress and pain. Animals in pain or moribund should be painlessly killed according to local euthanasia regulations. The Journal encourages corresponding authors of manuscripts involving animal research to refer to the [ARRIVE guidelines](#) before submission of a manuscript.

Potential threat to security

The Journal expects that all authors will conform to the [National Science Advisory Board for Biosecurity \(NSABB\)](#) guidelines for Dual Use Life Sciences Research. Where a reviewer is concerned that an article might include information that could be a threat to security then the Editor will treat the article as possible DURC (dual use research of concern) and may consult a specialist reviewer. Their advice will be taken into account by the Editor in making any final decision on publication.

Biosecurity

The Journal asks authors of papers related to [Schedule 5 biological agents](#) to inform the Editor at the time of manuscript submission if their study has the potential for both benevolent and malevolent application. This is often referred to as “dual use research of concern”. The [National Science Advisory Board for Biosecurity \(NSABB\)](#) guidelines state that a “dual use research of concern” can arise in relation to “research that, based on current understanding, can be reasonably anticipated to provide knowledge, products, or technologies that could be directly misapplied by others to pose a threat to public health and safety, agricultural crops and other plants, animals, the environment, or material”.

Antibiotic antimicrobial testing and microbial resistance

A number of methods like disc diffusion, Etest, agar dilution, broth microdilution and broth macrodilution, are suitable for *in vitro* antimicrobial susceptibility testing. However, the test used must be performed in accordance with an internationally accepted procedure; for example tests published by the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), the British Society for Antimicrobial Chemotherapy (BSAC), the Deutsches Institut für Normung e.V. (DIN) and the Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie (CA-SFM). Further guidance and interpretation of MIC 50 and MIC 90 values as well as guidance for the interpretation of multiresistance can be found in Schwarz *et al.* J. Antimicrobial Chemother 2010; 65: 601-604.

Data Sharing

This journal expects data sharing. Review [Wiley's Data Sharing policy](#) where you will be able to see and select the data availability statement that is right for your submission.

Data Availability

Data that is integral to the paper must be made available in such a way as to enable readers to replicate, verify and build upon the conclusions published in the paper. Any restriction on the availability of this data must be disclosed at the time of submission. Data may be included as part of the main article where practical. We recommend that data for which public repositories are widely used, and are accessible to all, should be deposited in such a repository prior to publication. The appropriate linking details and identifier(s) should then be included in the publication and where possible the repository, to facilitate linking between the journal article and the data. If such a repository does not exist, data should be included as supporting information to the published paper or authors should agree to make their data available upon reasonable request.

- Nucleotide sequence data should be deposited in the EMBL/GenBank/DBJ Nucleotide Sequence Data Libraries and the accession number referenced in the manuscript text, e.g. "E. coli (GenBank accession no. EUXXXXXX.X)". Sequence data should only be included if they are new (unpublished), complete (no unidentified nucleotides included) and if the sequence information itself provides important new biological insights of direct relevance to the question addressed in the manuscript. Generally sequences should not be submitted if the same gene has been reported in another species unless a comparison with related sequences contributes important new information.
- Presentation of nucleotide sequences should include clear indications of nucleotide numbers and points of interest, e.g. promoter sequences, ribosome binding sites, mutations, insertions, probe sequences, etc. In the case of comparisons, nucleotides which differ between the sequences should be readily visible to the reader, e.g. by the use of bold face, shading, boxing or by the use of a dash to represent identical nucleotides. The font size used in the manuscript should facilitate appropriate reduction of the figure.

Copyright Transfer Agreement

If your paper is accepted, the author identified as the formal corresponding author for the paper will receive an email prompting them to login into Author Services; where via the Wiley Author Licensing Service (WALS) they will be able to complete the license agreement on behalf of all authors on the paper.

For authors signing the copyright transfer agreement

If the OnlineOpen option is not selected the corresponding author will be presented with the copyright transfer agreement (CTA) to sign. The terms and conditions of the CTA can be previewed in the samples associated with the Copyright FAQs below: CTA Terms and Conditions http://authorservices.wiley.com/bauthor/faqs_copyright.asp

OnlineOpen

For authors choosing OnlineOpen

If the OnlineOpen option is selected the corresponding author will have a choice of the following Creative Commons License Open Access Agreements (OAA):

Creative Commons Attribution License OAA

Creative Commons Attribution Non-Commercial License OAA

Creative Commons Attribution Non-Commercial -NoDerivs License OAA

To preview the terms and conditions of these open access agreements please visit the Copyright FAQs hosted on Wiley Author

Services http://authorservices.wiley.com/bauthor/faqs_copyright.asp and visit <http://www.wileyopenaccess.com/details/content/12f25db4c87/Copyright--License.html>.

If you select the OnlineOpen option and your research is funded by The Wellcome Trust and members of the Research Councils UK (RCUK) you will be given the opportunity to publish your article under a CC-BY license supporting you in complying with Wellcome Trust and Research Councils UK requirements. For more information on this policy and the Journal's compliant self-archiving policy please visit: <http://www.wiley.com/go/funderstatement>.

Referrals to the Open Access Journal *MicrobiologyOpen* and *Food Science & Nutrition*

This journal works together with two of Wiley's open access journals, *MicrobiologyOpen* and *Food Science & Nutrition*, to enable rapid publication of good quality research that is unable to be accepted for publication by our journal. Authors may be offered the option of having the paper, along with any related peer reviews, automatically transferred for consideration by one of these two journals. *MicrobiologyOpen* and *Food Science & Nutrition* are Wiley open access journals and article publication fees apply. For more information, please go to www.microbiologyopen.com/info and www.foodscience-nutrition.com/info.

MANUSCRIPT PREPARATION AND PRESENTATION

Manuscripts should be drafted as concisely as possible and should contain no more than five figures and tables in total. It is advised that manuscripts are approximately 4000 words excluding figures and tables, but there is no strict upper limit. The Editors reserve the right to require authors to reduce the length of their manuscript. Manuscripts will not be reviewed unless the English is of a publishable standard.

It is strongly recommended that you use the [author submission checklist](#) to help you to prepare your submission to the Journal.

The main text of the manuscript should be prepared as a Word document (.doc) or Rich Text Format (.rtf) file. Text must be double-spaced, and the pages of the manuscript must be numbered consecutively.

The title page should show the title of the manuscript; the names of authors and place(s) where the work was done; an abbreviated running headline not exceeding 35 letters and spaces; and the complete contact details for the corresponding author.

Original Articles should contain the following sections in this order:

- **SIGNIFICANCE AND IMPACT OF THE STUDY:** This highlight section should explain the significance and impact of the manuscript in up to 100 words. [Click here](#) to read more about what should be included in this section.

- **ABSTRACT:** A brief summary of up to 200 words, the abstract should give the major findings of the investigation. The text should be unstructured, with no section headings. A list of between five and eight keywords should also be added;
- **INTRODUCTION:** A balance must be struck between the pure and applied aspects of the subject;
- **RESULTS AND DISCUSSION (combined):** Well-prepared tables and figures must be a cardinal feature of this section as they convey the major observations to readers. Information provided in tables and figures should not be repeated in the text, but focus attention on the importance of the significance and impact of the principal findings of the study.
- **MATERIALS AND METHODS:** Ensure that the work can be repeated according to the details provided. By submission of a manuscript, the authors consent that biological material, including plasmids, viruses and microbial strains, unobtainable from national collections will be made available to members of the scientific community for non-commercial purposes subject to national and international regulations governing the supply of biological material. In the case of a new diagnostic PCR, you should consider the need for an internal amplification control (JAM 2004 96(2):221; available [here](#)).
- **ACKNOWLEDGEMENTS:** Contributors who do not qualify as authors should be acknowledged and their particular contribution described. All sources of funding for the work reported, for all the authors, must be acknowledged. Both the research funder and the grant number (if applicable) should be given for each source of funds;
- **CONFLICT OF INTEREST:** If no conflict of interest exists, then 'no conflict of interest declared' should appear within this section. Otherwise, authors should list all pertinent commercial and other relationships that may be perceived as a potential source of conflict of interest.
- **REFERENCES;**
- **GRAPHICAL ABSTRACT:** Authors are asked to prepare a graphical abstract image for the electronic table of contents (eTOC). These images are meant to attract reader interest and may encapsulate a key result or conclusion of the paper. Appropriate images might include molecular or cellular structures, appealing graphics, or models or summary figures. A figure (or panel of a figure) from the main text may be used, if appropriate, or an image may be prepared specifically for this purpose. Please note that this image will appear in the eTOC as thumbnail image, which readers may click on to enlarge to full size. The submitted image should be closely cropped, approximately square in shape and high resolution (600 dpi) at single column width (80 mm). Allowed heights are between 60 and 100 mm;
- **SUPPORTING INFORMATION (if applicable):** Supporting Information can be a useful way for an author to include important but ancillary information with the online version of an article. Examples of Supporting Information include additional tables, data sets, figures, movie files, audio clips, 3D structures, and other related nonessential multimedia files. Supporting Information should be cited within the article text. The availability of supporting information should be indicated in the main manuscript by a section headed 'Supporting Information', under which should be appropriate legends for the material. It is published as supplied by the author, and a proof is not made available prior to publication; for these reasons, authors should provide any Supporting Information in the desired final format. For further information on recommended file types and requirements for submission, please visit: <http://authorservices.wiley.com/bauthor/supinfo.asp>

The headings in review articles are of the author's choice. There is no requirement for review articles to have a 'significance and impact' section; this is at the discretion of the author. As references can make a heavy demand on the pages available to you, it is suggested that you select key references only.

Please check and confirm that your article is optimized for search engines. Keywords should appear in the title, abstract and throughout your article in order to increase your article's online visibility. For more information please see [Writing for SEO](#).

References

The Harvard system should be used. Citation of references having three or more names should be cited in the text as Jones et al. (1992) at the first and subsequent times of quoting the reference. A series of references should be given in ascending date order (Green and Smith 1946; Jones *et al.* 1956). Names with the prefixes de, do van, von, etc. will be placed in alphabetical order of the first letter of the prefix, e.g. von Braun would appear under 'V'. Different publications having the same author(s) and year will be distinguished by, for example, 1992a, 1992b. Papers or other publications having no obvious author(s) should usually be cited as 'Anon.' with the year in the text and bibliography. Web sites should be quoted in the text with an access date. Abbreviate journal titles according to Index Medicus (http://www.nlm.nih.gov/tsd/serials/terms_cond.html). Personal communications should be cited in the text with initials and family name of all individuals.

The following is an example of order and style to be used in the manuscript:

Fricker, C.R. (1995) Detection of *Cryptosporidium* and *Giardia* in water. In *Protozoan Parasites in Water* ed. Betts, W.B., Casemore, D., Fricker, C.R., Smith, H.V. and Watkins, J. pp.91-96. London: The Royal Society of Chemistry.

Garner, J.S. and Favero, M.S. (1985) *Guidelines for Handwashing and Hospital Environment Control*. US Public Health Service, Centers for Disease Control HHS No. 99-117. Washington DC: Government Printing Office.

Laverick, M.A., Wyn-Jones, A.P. and Carter, M.J. (2004) Quantitative RT-PCR for the enumeration of noroviruses (Norwalk-like viruses) in water and sewage. *Lett Appl Microbiol* **39**, 127-135.

As space in LAM is at a premium, manuscripts must contain no more than five figures and tables IN TOTAL.

Tables

It is mandatory to submit your paper with tables embedded throughout the main body of text for review purposes. However, please ensure you also upload a file with the main text only, and tables and figures uploaded separately for editing purposes. Tables must not include ruled vertical or horizontal lines with the exception of headers and a footer (see example). The use of explanatory footnotes is permissible and they should be marked by the following (shown in order of preference): *, †, ‡, §, ¶, **, †† etc. For an example of table style, [click here](#).

Figures

It is mandatory to submit your paper with figures embedded throughout the main body of text for review purposes. However, please ensure you also upload a file with the main text only, and tables and figures uploaded separately for editing purposes. Authors are advised that poor quality figures may delay the publication of their paper. Symbols or keys representing data series in graphs and charts must not be shown on the figure itself but be included in the legend. For an example of figure style, [click here](#).

Photographs must be of good quality and high contrast. The magnification must be indicated by adding a bar representing a stated length. Composite photographs can reduce the numbers that require publication. The Journal will not accept figures illustrating SDS-PAGE and agarose gels with multiple lanes, where lane order has been rearranged using digital imaging software. The figure should also show sufficient of the gel to reveal reference markers (e.g. the sample origin and a tracker dye, or a lane of molecular mass markers).

- Save line art such as charts, graphs and illustrations in EPS or PDF format. Most programs have a 'Save as...' or 'Export...' feature to allow you to do this
- Save photographic images in TIFF format. These should be at a resolution of at least 300 dpi at final size
- Save figures containing a combination of photographic images and text (eg annotated photographic images with text labels) as EPS or PDF. Any photographic images embedded within these should be at least 300 dpi
- Perform a visual check of the quality of the generated image. You should be able to zoom in to about 300% without the image becoming noticeably blurred or pixelated. If the image does appear pixelated at this zoom, then try going back to the original image and checking that it complies with the recommended format and settings
- Detailed information on the submission of electronic artwork can be found at: http://media.wiley.com/assets/7323/92/electronic_artwork_guidelines.pdf

Colour figures

Colour in figures are free of charge, however it is essential that the figure legends apply equally well to both printed greyscale and online colour versions, and do not specifically refer to the colour.

English usage, abbreviations and units

Use 'z' spelling where possible, except analyse, dialyse, hydrolyse, etc.; sulphur, sulphate, etc. When using numbers in the text, one to nine should be written in full and 10 and above should be written as numerals. The Journal uses SI units: g l⁻¹ not g/l; d, h, min, s (time units) but week and year in full; mol l⁻¹ (not M or N); probability is P; centrifugation conditions relative to gravity (g). Please refer to the Biochemical Journal 'Instructions to Authors' www.biochemj.org/bj/bji2a.htm.

Please [click here](#) for some examples of common abbreviations used in the Journal

Microbial nomenclature

The Latin binomial name of micro-organisms, plants and animals (other than farm animals) must be given at first mention in the text; thereafter the generic name will be abbreviated in such a way that confusion is avoided when dealing with several genera all beginning with the same letter, viz. *Pseudomonas*, *Proteus*, *Pediococcus*, etc. (see list of abbreviations below). Subspecies are italicized (*Corynebacterium diphtheriae* subsp. *mitis*); groups and types are printed in Roman and designated by capital letters or Arabic figures (e.g. *Staphylococcus aureus* group A). Common names will not have an initial capital letter nor will they be underlined in the manuscript, viz. pseudomonad, salmonellas. The specific name will be given in full in the captions to tables and figures. Major ranks are written in Roman with an initial capital (e.g. Enterobacteriaceae).

Please [click here](#) for a list of abbreviations currently in use for common generic names and for notes on referring to plant pathogenic bacteria.

Gnotobiotic animals

The terminology for describing the environmental status of animals in gnotobiotic experiments has established itself by usage. *Germ-free* implies freedom from any detectable microorganisms or viruses and it is limited by the tests used to detect contaminants. *Conventional animals* have a full complement of associated microbes. *Open conventional animals* are housed in a standard animal house. *Isolator conventional animals* are maintained in isolators and associated with full flora. *Ex-germ-free animals* are those with an associated flora which have become conventional.

Statistics

Tests must be presented clearly to allow a reader with access to the data to repeat them. Statistical tests used in the study should be clearly indicated in the Materials and Methods section. It is not necessary to describe every statistical test fully, as long as it is clear from the context what was done. In particular, null hypotheses should be clearly stated.

Authors are urged to give consideration to the assumptions underlying any statistical tests used and to assure the reader that the assumptions are at least plausible. Authors should be prepared to use nonparametric tests if the assumptions do not seem to hold.

Footnotes

Not permitted other than on the first page of a manuscript where they are used to show the author's change of address and the address for correspondence.

Experimental hazards

Chemical or microbiological hazards that may be involved in the experiments must be explained. Authors should provide a description of the relevant safety precautions adopted or cite an accepted 'Code of Practice'.

English-language editing service

Ensure your paper is clearly written in standard, scientific English language appropriate to your discipline. [Visit our site](#) to learn about the options. Please note that using the Wiley English Language Editing Service does not guarantee that your paper will be accepted by this journal.

AFTER ACCEPTANCE

Accepted Articles

'Accepted Articles' have been accepted for publication and undergone full peer review but have not been through the copyediting, typesetting, pagination and proofreading process. Accepted Articles are published online a few days after final acceptance, appear in PDF format only, and are given a Digital Object Identifier (DOI) which allows them to be cited and tracked. A completed copyright form is required before a manuscript can be processed as an Accepted Article. Once the manuscript has been through the production process the article is removed from the Accepted Articles area and published as Early View.

Proofs

The corresponding author will receive an email alert containing a link to a web site. A working email address must therefore be provided for the corresponding author. The proof can be downloaded as a PDF file from this site and corrections made following the instructions sent with the proofs. Excessive changes made by the author in the proofs, excluding typesetter errors, may be charged separately.

Early View

Letters in Applied Microbiology is covered by Wiley Online Library's Early View service. Early View articles are complete full-text articles published online in advance of their publication in a printed issue. Articles are therefore available as soon as they are ready, rather than having to wait for the next scheduled print issue. Early View articles are complete and final. They have been fully reviewed, revised and edited for publication, and the authors' final corrections have been incorporated. Because they are in final form, no changes can be made after online publication. The nature of Early View articles means that they do not yet have volume, issue or page numbers, so Early View articles cannot be cited in the traditional way. They are therefore given a Digital Object Identifier (DOI), which allows the article to be cited and tracked before it is allocated to an issue. After print publication, the DOI remains valid and can continue to be used to cite and access the article. More information about DOIs can be found at: <http://www.doi.org/faq.html>.

Offprints

A PDF offprint of the online published article will be provided free of charge to the corresponding author, and may be distributed subject to the Publisher's terms and conditions. Free access to the final PDF offprint or your article will be available via author services only. Please therefore sign up for author services if you would like to access your article PDF offprint and enjoy the many other benefits the service offers. Paper offprints of the printed published article may be purchased if ordered via the method stipulated on the instructions that will accompany the proofs. Printed offprints are posted to the correspondence address given for the paper unless a different address is specified when ordered. Note that it is not uncommon for printed offprints to take up to eight weeks to arrive after publication of the Journal.

Note to NIH Grantees

Pursuant to NIH mandate, Wiley will post the accepted version of contributions authored by NIH grant-holders to PubMed Central upon acceptance. This accepted version will be made publicly available 12 months after publication. For further information, see www.wiley.com/go/nihmandate.

Author material archive policy

Please note that unless specifically requested, Wiley will dispose of all hardcopy or electronic material submitted 2 months after publication. If you require the return of any material submitted, please inform the Managing Editor or Production Editor.

Disclaimer

Whilst every effort is made by the Publishers and Editorial Board to see that no inaccurate or misleading data, opinion or statement appears in this Journal, they wish to make it clear that the data and opinions appearing in the articles and advertisements herein are the sole responsibility of the contributor or advertiser concerned. Accordingly, the Publishers and Editors and their respective employees, officers and agents accept no responsibility or liability whatsoever for the consequences of any such inaccurate or misleading data, opinion or statement.

CAPÍTULO II:

AMERICAN JOURNAL OF INFECTION CONTROL

GUIDE FOR AUTHORS

INTRODUCTION

The *American Journal of Infection Control* (AJIC) is a professional, peer-reviewed journal and the official scientific publication of the Association for Professionals in Infection Control and Epidemiology, Inc. AJIC welcomes original articles in English pertaining to the prevention, surveillance, and control of infections and related complications in health care facilities and the community, and the application of epidemiologic principles to reduce risks among patients and health care professionals.

Article Types

Authors may submit any of the following types of articles.

Major articles. Articles in this category usually present results of original research undertaken by the author. Typically these articles average 12-15 double-spaced typewritten pages with up to 5 tables and/or figures, and 15-25 references. Authors must include a structured abstract of 150 to 200 words. Structured abstracts should include Background, Methods, Results (including some data), Discussion, and Conclusions. Articles which focus on comparative effectiveness research and implementation or translational science are particularly welcome.

Brief reports. Articles in this category should be limited to 1000 words or less and may include two illustrations or tables and a maximum of 10 references. A summary (non-structured) 2-3 sentence abstract of 50 to 75 words should accompany Brief Reports.

Commentary. Opinions, philosophy, or comments related to infection control and prevention practices should be submitted through the editorial system for review. They should be brief and referenced whenever appropriate. Do not include an abstract.

Correspondence. Letters pertaining to articles published in the Journal or concerned with issues of current interest to readers should be submitted through the online editorial system and kept to 2-3 double-spaced pages. They are subject to review and/or responses by authors of the pertinent papers.

Practice Forum. Reports of infection prevention and control practices and related applications of epidemiology will be published. Items should be limited to two to five typed double-spaced pages, referenced whenever appropriate. A summary abstract of 50 to 75 (non-structured) words should accompany these submissions.

State of the Science Reviews. Comprehensive or systematic reviews and meta-analyses of topics relevant to infection prevention and control. The PRISMA Statement for transparent reporting of systematic reviews and meta-analyses (<http://www.prisma-statement.org/>) should be used as a guideline.

Submission checklist

You can use this list to carry out a final check of your submission before you send it to the journal for review. Please check the relevant section in this Guide for Authors for more details.

Ensure that the following items are present:

One author has been designated as the corresponding author with contact details:

- E-mail address
- Full postal address

All necessary files have been uploaded:

Manuscript:

- Include keywords
- All figures (include relevant captions)
- All tables (including titles, description, footnotes)
- Ensure all figure and table citations in the text match the files provided
- Indicate clearly if color should be used for any figures in print *Graphical Abstracts / Highlights files* (where applicable) *Supplemental files* (where applicable)

Further considerations

- Manuscript has been 'spell checked' and 'grammar checked'
- All references mentioned in the Reference List are cited in the text, and vice versa
- Permission has been obtained for use of copyrighted material from other sources (including the Internet)
- A competing interests statement is provided, even if the authors have no competing interests to declare
- Journal policies detailed in this guide have been reviewed
- Referee suggestions and contact details provided, based on journal requirements

For further information, visit our [Support Center](#).

BEFORE YOU BEGIN

Ethics in publishing

Please see our information on [Ethics in publishing](#).

Institutional Review Board

When research involves human participants, authors should state in the "Methods" section the procedure used to ensure ethical conduct of research.

Conflict of Interest

Please note in your cover letter to the editor accompanying your submission whether any of the contributing authors may have a conflict of interest. This is in addition to uploading the signed Conflict of Interest forms. All authors must disclose any financial and personal relationships with other people or organizations that could inappropriately influence (bias) their work. Examples of potential conflicts of interest include employment, consultancies, stock ownership, honoraria, paid expert testimony, patent applications/registrations, and grants or other funding. Please see the ICMJE author responsibilities regarding conflicts of interest (<http://www.icmje.org/conflicts-of-interest/>). This form must be completed by ALL contributing authors and uploaded with the manuscript at the time of submission.

Financial Disclosure

Authors are requested to disclose to the editors receipt of financial and/or material support from an organization that may either gain or lose financially from the results or conclusions of their study or commentary. Such disclosure(s) will not be released to peer reviewers.

Prior Publication. At the time of submission, editorial manager (EM) will prompt the corresponding author to state whether any portion the data or results are under consideration

by another journal or have been published elsewhere.

AJIC disapproves of duplicate publication. Authors should avoid reporting results of the same component of a study in separate manuscripts submitted to separate journals. For example, authors should refrain from submitting data from the same study that is analyzed in a similar fashion to construct two seemingly distinct papers. The Journal does not consider conference abstracts that report preliminary research findings as an instance of prior publication.

Submission declaration and verification

Submission of an article implies that the work described has not been published previously (except in the form of an abstract, a published lecture or academic thesis, see '[Multiple, redundant or concurrent publication](#)' for more information), that it is not under consideration for publication elsewhere, that its publication is approved by all authors and tacitly or explicitly by the responsible authorities where the work was carried out, and that, if accepted, it will not be published elsewhere in the same form, in English or in any other language, including electronically without the written consent of the copyright holder. To verify originality, your article may be checked by the originality detection service [Crossref Similarity Check](#).

Use of inclusive language

Inclusive language acknowledges diversity, conveys respect to all people, is sensitive to differences, and promotes equal opportunities. Content should make no assumptions about the beliefs or commitments of any reader; contain nothing which might imply that one individual is superior to another on the grounds of age, gender, race, ethnicity, culture, sexual orientation, disability or health condition; and use inclusive language throughout. Authors should ensure that writing is free from bias, stereotypes, slang, reference to dominant culture and/or cultural assumptions. We advise to seek gender neutrality by using plural nouns ("clinicians, patients/clients") as default/wherever possible to avoid using "he, she," or "he/she." We recommend avoiding the use of descriptors that refer to personal attributes such as age, gender, race, ethnicity, culture, sexual orientation, disability or health condition unless they are relevant and valid. When coding terminology is used, we recommend to avoid offensive or exclusionary terms such as "master", "slave", "blacklist" and "whitelist". We suggest using alternatives that are more appropriate and (self-) explanatory such as "primary", "secondary", "blocklist" and "allowlist". These guidelines are meant as a point of reference to help identify appropriate language but are by no means exhaustive or definitive.

This policy concerns the addition, deletion, or rearrangement of author names in the authorship of accepted manuscripts:

Before the accepted manuscript is published in an online issue: Requests to add or remove an author, or to rearrange the author names, must be sent to the Managing Editor from the corresponding author of the accepted manuscript and must include: (a) the reason the name should be added or removed, or the author names rearranged and (b) written confirmation (e-mail, fax, letter) from all authors that they agree with the addition, removal or rearrangement. In the case of addition or removal of authors, this includes confirmation from the author being added or removed. Requests that are not sent by the corresponding author will be forwarded by the Managing Editor to the corresponding author, who must follow the procedure as described above. Note that: (1) the Managing Editor will inform the Journal Editor of any such requests and (2) publication of the accepted manuscript in an online issue is suspended until authorship has been agreed.

After the accepted manuscript is published in an online issue: Any requests to add, delete, or rearrange author names in an article published in an online issue will follow the same policies as noted above and result in an erratum.

Photographs

Photographs of identifiable persons must be accompanied by signed releases showing informed consent.

Copyright

Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete a 'Journal Publishing Agreement' (see [more information](#) on this). An e-mail will be sent to the corresponding author confirming receipt of the manuscript together with a 'Journal Publishing Agreement' form or a link to the online version of this agreement.

Subscribers may reproduce tables of contents or prepare lists of articles including abstracts for internal circulation within their institutions. [Permission](#) of the Publisher is required for resale or distribution outside the institution and for all other derivative works, including compilations and translations. If excerpts from other copyrighted works are included, the author(s) must obtain written permission from the copyright owners and credit the source(s) in the article. Elsevier has [preprinted forms](#) for use by authors in these cases.

Author rights

As an author you (or your employer or institution) have certain rights to reuse your work. [More information](#).

Reporting guidelines

Certain research designs should be reported in AJIC articles according to the following reporting guidelines: [CONSORT](#) and its extensions for randomized controlled trials; [STROBE](#) and its extensions for observational studies; [PRISMA](#) for systematic reviews and meta-analysis; and [ORION](#) for outbreak reports and interventional, non-randomized studies of nosocomial infections. The appropriate checklist should be submitted at the time of the article submission. Reporting guidelines for other types of study can be found at the EQUATOR network site: <http://www.equator-network.org/reporting-guidelines>

Elsevier supports responsible sharing

Find out how you can [share your research](#) published in Elsevier journals.

Role of the Funding Source

You are requested to identify any source(s) of financial support for the conduct of the research and/or preparation of the article and to briefly describe the role of the sponsor(s), if any, in study design; in the collection, analysis and interpretation of data; in the writing of the report; and in the decision to submit the article for publication. If the funding source(s) had no such involvement then this should be stated. Please see <https://www.elsevier.com/funding>.

Authors who have received financial support from a funding agency or manufacturer or been given a product free of charge to use in a study must acknowledge this support at the time of submission. At the time of submission, EM will prompt the corresponding author to disclose this information. If a submission is accepted for publication, the editors will ask the authors to detail this information in their final manuscript for publication in the Journal.

Funding Body Agreements and Policies

Elsevier has established agreements and developed policies to allow authors whose articles appear in journals published by Elsevier to comply with potential manuscript archiving requirements as specified as conditions of their grant awards. To learn more about existing agreements and policies please visit <https://www.elsevier.com/fundingbodies>.

Open access

Please visit our [Open Access page](#) for more information.

Language Services

Please write your text in standard American English. Authors who feel their English language

manuscript may require editing to eliminate possible grammatical or spelling errors and to conform to correct scientific English may wish to use the English Language Editing service available from Elsevier's WebShop, <https://webshop.elsevier.com/language-editing-services/language-editing/>, or visit our customer support site, <https://service.elsevier.com>, for more information. AJIC does not provide grammatical editing services and will return papers that do not meet minimum language requirements for additional editing prior to consideration.

Submission

Submission to this Journal proceeds totally online and you will be guided stepwise through the creation and uploading of your files. The system automatically converts source files to a single PDF file of the article, which is used in the peer-review process. Please note that even though manuscript source files are converted to PDF files at submission for the review process, these source files are needed for further processing after acceptance. All correspondence, including notification of the Editor's decision and requests for revision, takes place by e-mail.

Troubleshooting. If you are trying to upload a PDF and receive an error message, please check to make sure no files are locked and that there are no periods (“.”) in the title of any document, as these will result in a PDF build error.

AJIC uses a Web-based online manuscript submission and review system-Editorial Manager (EM). The Web site guides authors stepwise through the creation and uploading of the various files. Note that original source files (not PDF files) are required. Authors may send queries concerning the submission process or Journal procedures to the Editorial Office at ajic@columbia.edu. Once the submission files are uploaded, EM automatically generates a PDF proof, which is then used for reviewing. All correspondence, including the Editor's decision and request for revisions, will be by e-mail via EM.

The *American Journal of Infection Control* adheres to [COPE international standards](#) for editors and authors.

Submit your article

Please submit your article via <https://www.editorialmanager.com/AJIC/default.aspx>.

PREPARATION

The following guidelines for submission of manuscripts will expedite the review process and ensure that publication is not delayed.

New Submissions

Submission to this journal proceeds totally online and you will be guided stepwise through the creation and uploading of your files. The system automatically converts your files to a single PDF file, which is used in the peer-review process.

This must be submitted as a Word document, in any format or lay-out that can be used by referees to evaluate your manuscript. It should contain high enough quality figures for refereeing. If you prefer to do so, you may still provide all or some of the source files at the initial submission. Please note that individual figure files larger than 10 MB must be uploaded separately.

References

There are no strict requirements on reference formatting at submission. References can be in any style or format as long as the style is consistent. Where applicable, author(s) name(s), journal title/book title, chapter title/article title, year of publication, volume number/book chapter and the article number or pagination must be present. Use of DOI is highly encouraged. The reference style used by the journal will be applied to the accepted article by Elsevier at the proof stage. Note that missing data will be highlighted at proof stage for the author to correct.

Figures and tables embedded in text

Please ensure the figures and the tables included in the single file are placed next to the relevant text in the manuscript, rather than at the bottom or the top of the file. The corresponding caption should be placed directly below the figure or table.

REVISED SUBMISSIONS

Regardless of the file format of the original submission, at revision you must provide us with an editable file of the entire article. Keep the layout of the text as simple as possible. Please remove all track changes from final revision before uploading to the EM system. Most formatting codes will be removed and replaced on processing the article. The electronic text should be prepared in a way very similar to that of conventional manuscripts (see also the Guide to Publishing with Elsevier: <https://www.elsevier.com/guidepublication>). See also the section on Electronic artwork.

To avoid unnecessary errors you are strongly advised to use the 'spell-check' and 'grammar-check' functions of your word processor.

EXAMPLE Response to Reviewer Comments

When responding to reviewer comments in your revised manuscript, please format your changes using the following as an example. You must respond to each comment point-by-point.

Reviewer #1:

Strengths: new material, large sample size of observations, next step in attacking the problem of nonadherence to stethoscope hygiene, specific barriers and their relative perceived importance given. Honest conclusion (no impact on adherence), realistic setting and participants.

Thank you!

Weaknesses: no comparison among methods used for convenience, preference by percentage, or other factors. Few comments on any teaching done, but maybe this was because they were isolating the effect of the visuals on behavior.

We agree. While we did survey the providers as to which method they found more effective in terms of bioluminescence vs seeing cultures, in hindsight we could have been more rigorous about trying to compare the two methods. Despite using both bioluminescence and showing providers images of their cultures, we did not see objective impact on adherence therefore I suspect if we had done either in isolation, we would not have seen an objective impact on adherence. We agree that while our prior QI project had focused on education and failed to change behavior, this project focused on whether the visual impact of seeing what's growing on one's own stethoscope and seeing the large drop in bioluminescence scores could change behavior. If successful, our hope was actually to create a visual tool which could be disseminated to other VA hospitals.

Reviewer #2:

This was a nice follow up to the initial study. The data and stats support your conclusions. *Thank you.*

There are still important questions either to answer in this or future articles. It appears that visual proof for the participants was not enough to increase adherence to stethoscope hygiene, as they had stated. Did you collect data regarding WHICH method of cleaning was preferred, and if this choice impacted compliance for both hand and stethoscope hygiene? It would seem that conducting BOTH hand and stethoscope hygiene with ABHR would have advantages over barriers stated in the conclusion, namely: forgetfulness, time constraints, and limited

access to supplies. It would be interesting to see why participants preferred a given method.

Unfortunately, we did not collect data regarding which cleaning method was preferred. We did give providers a choice of what disinfection method to use before reculturing their stethoscope or doing the post-disinfection bioluminescence swabs. Anecdotally some providers said "well I usually use

_____method therefore let's do the_____ method? but we did not formally track this and we did not link any survey responses or objective measurements to disinfection method. However, we agree this would be an interesting thing to explore in the future. We agree that the perceived barriers of forgetfulness, time constraints and limited access to supplies should be much less of a factor if at all with ABHR which is why we wanted to visually demonstrate that it works as well as the other methods, and that "all 3 methods work-take your pick- just do something!"

It would also be interesting to see if those who used a stethoscope on a patient cleaned their scopes, and what percentage this represents. Could the group be polled after a patient encounter and "observation" of hygiene to see how many used their stethoscopes and then recalculate compliance?

This is one of our limitations. We are unable to retrospectively ascertain who did or did not use their stethoscopes during an encounter as our observations were anonymous and did not record providers' names. Our methodology relied on secret observers outside the room so that providers were unaware that they were being observed. Anecdotally we have noticed that how team rounds are done is very attending dependent, where sometimes only one or two providers on a team entering the room used their stethoscope but it is very variable depending on the attending. For our work, we mentioned it as a limitation but I think it would require an imbedded observer in the room itself in future work.

This comment is off the record, but it seems there may be more cultural influences at work than suspected. Is it possible to give the attendings and other leaders the task of DEMONSTRATING the technique and monitor them confidentially on rounds and let them know their compliance? They may believe this is the "flavor of the month" and give lip service. It is also a new concept compared to hand hygiene. I think too if one sees the combination of hand and stethoscope hygiene with ABHR, their may clear advantages (no need to find wipes, throw them away, then find ABHR for hands... etc).

I fully agree. We intentionally did not track compliance by attending or level or training so that we wouldn't have identifiers however anecdotally if I consistently demonstrate the technique when I am on the rounds, I do think that the team does a better job with it. I agree that this could be a strategy to pursue in the future. Thank you for the suggestion.

Article structure

Manuscripts must conform to acceptable English usage. For current usage, consult the AMA Manual of Style, A Guide for Authors and Editors, Tenth Edition, ISBN 0-978-0-19-517633-9 (see [http:// www.amamanualofstyle.com](http://www.amamanualofstyle.com)). Generic drug and product names should be used; however, proprietary names may be inserted in parentheses after the generic name **in the Methods section only**. If equipment must be identified by proprietary name, provide the manufacturer name and city/state in the Methods section while referring to it generically elsewhere in the paper. Weights and measures should be expressed in metric units. Temperatures should be expressed in degrees centigrade.

Manuscript pages. The abstract should follow the title page. Authors should double-space all

text, maintain one-inch page margins and use a basic font such as New Times Roman. The references should be included in the same file as the manuscript.

Double-blind Review

This journal uses double-blind review, which means that both the reviewer and author name(s) are not revealed to one another for a manuscript under review. The identities of the authors are concealed from the reviewers, and vice versa. For more information please refer to <https://www.elsevier.com/reviewers/peer-review>. To facilitate this, please include the following separately:

Title page (with author details): This should include the title, authors' names and affiliations, and a complete address for the corresponding author including telephone and e-mail address.

Abstract (when applicable): This should be a formatted version of the paper's abstract, submitted separately.

Blinded manuscript (no author details): The main body of the paper (including acknowledgments, references, tables, and figures) **should not include any identifying information**, such as the authors' names or affiliations.

Background

State the objectives of the work and provide an adequate background, avoiding a detailed literature survey or a summary of the results.

Material and methods

Provide sufficient details to allow the work to be reproduced by an independent researcher. Methods that are already published should be summarized, and indicated by a reference. If quoting directly from a previously published method, use quotation marks and also cite the source. Any modifications to existing methods should also be described.

Results

Results should be clear and concise.

Discussion

This should explore the significance of the results of the work, not repeat them. A combined Results and Discussion section may sometimes be appropriate. Avoid extensive citations and discussion of published literature.

Conclusions

The main conclusions of the study may be presented in a short Conclusions section, which may stand alone or form a subsection of a Discussion section.

Appendices

If there is more than one appendix, they should be identified as A, B, etc. Formulae and equations in appendices should be given separate numbering: Eq. (A.1), Eq. (A.2), etc.; in a subsequent appendix, Eq. (B.1) and so on. Similarly for tables and figures: Table A.1; Fig A.1, etc. Generally, however, appendices are not recommended but may be made available by request from the authors for reviewers, or for readers if the manuscript is accepted for publication.

Essential Title Page Information

- **Title.** Concise and informative; brief and not laden with too much detail. Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations and formulae where possible.
- **Title page.** The first title page should include the title; name(s) and academic degree(s) of the author(s); name(s) of the department(s) and institution(s) in which the work was done; and name, address, business and home telephone numbers, and e-mail address of the author to whom correspondence and reprint requests should be addressed.

- **Author names and affiliations.** Where the family name may be ambiguous (e.g., a double name), please indicate this clearly. Present the authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a lower-case superscript letter immediately after the author's name and in front of the appropriate address. Provide the full postal address of each affiliation, including the country name and, if available, the e-mail address of each author.
- **Corresponding author.** Clearly indicate who will handle correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication. **Ensure that phone numbers (with country and area code) are provided in addition to the e-mail address and the complete postal address. Contact details must be kept up to date by the corresponding author.**
- **Present/permanent address.** If an author has moved since the work described in the article was done, or was visiting at the time, a 'Present address' (or 'Permanent address') may be indicated as a footnote to that author's name. The address at which the author actually did the work must be retained as the main affiliation address.

Save this title page as a separate file for your submission via EM. A second title page without any author information should begin the full manuscript file. This page will be used for double-blind peer review.

Highlights

Highlights are mandatory for this journal as they help increase the discoverability of your article via search engines. They consist of a short collection of bullet points that capture the novel results of your research as well as new methods that were used during the study (if any). Please have a look at the examples here: [example Highlights](#).

Highlights should be submitted in a separate editable file in the online submission system. Please use 'Highlights' in the file name and include 3 to 5 bullet points (maximum 85 characters, including spaces, per bullet point).

Structured abstract

A structured abstract, by means of appropriate headings, should provide the context or background for the research and should state its purpose, basic procedures (selection of study subjects or laboratory animals, observational and analytical methods), main findings (giving specific effect sizes and their statistical significance, if possible), and principal conclusions. It should emphasize new and important aspects of the study or observations.

Unstructured abstracts

Unstructured abstracts are used for Brief Reports.

Graphical abstract

Although a graphical abstract is optional, its use is encouraged as it draws more attention to the online article. The graphical abstract should summarize the contents of the article in a concise, pictorial form designed to capture the attention of a wide readership. Graphical abstracts should be submitted as a separate file in the online submission system. Image size: Please provide an image with a minimum of 531×1328 pixels (h $\times$ w) or proportionally more. The image should be readable at a size of 5×13 cm using a regular screen resolution of 96 dpi. Preferred file types: TIFF, EPS, PDF or MS Office files. You can view [Example Graphical Abstracts](#) on our information site.

Authors can make use of Elsevier's [Illustration Services](#) to ensure the best presentation of their images and in accordance with all technical requirements.

Keywords

Immediately after the abstract, provide a maximum of 6 keywords, using American spelling and avoiding general and plural terms and multiple concepts (avoid, for example, 'and', 'of'). Be sparing with abbreviations: only abbreviations firmly established in the field may be eligible.

These keywords will be used for indexing purposes.

Abbreviations

Standard abbreviations should be used consistently throughout the article. Unusual or coined abbreviations should be spelled out the first time they appear in text, with abbreviation in parentheses. Ensure consistency of abbreviations throughout the article.

Acknowledgments

Collate acknowledgements in a separate section at the end of the article before the references and do not, therefore, include them on the title page, as a footnote to the title or otherwise. List those individuals who provided help during the research (e.g., providing language help, writing assistance or proof reading the article, collecting data, etc).

Math formulae

Please submit math equations as editable text and not as images. Present simple formulae inline with normal text where possible and use the solidus (/) instead of a horizontal line for small fractional terms, e.g., X/Y. In principle, variables are to be presented in italics. Powers of e are often more conveniently denoted by exp. Number consecutively any equations that have to be displayed separately from the text (if referred to explicitly in the text).

Table footnotes

Indicate each footnote in a table by using the symbols hierarchy (i.e., *, †, ‡, §, etc).

Footnotes

Footnotes should be used sparingly. Number them consecutively throughout the article. Many word processors build footnotes into the text, and this feature may be used. Should this not be the case, indicate the position of footnotes in the text and present the footnotes themselves separately at the end of the article.

Artwork

k

*Electro
nic*

artwor

k

*Gener
al*

points

- Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork.
- Preferred fonts: Arial (or Helvetica), Times New Roman (or Times), Symbol, Courier.
- Number the illustrations according to their sequence in the text.
- Use a logical naming convention for your artwork files.
- Indicate per figure if it is a single, 1.5 or 2-column fitting image.
- For Word submissions only, you may still provide figures and their captions, and tables within a single file at the revision stage.
- Please note that individual figure files larger than 10 MB must be provided in separate source files.

A detailed [guide on electronic artwork](#) is available.

You are urged to visit this site; some excerpts from the detailed information are given here.

Formats

Regardless of the application used, when your electronic artwork is finalized, please 'save as' or convert the images to one of the following formats (note the resolution requirements for line drawings, halftones, and line/halftone combinations given below):

EPS (or PDF): Vector drawings. Embed the font or save the text as 'graphics'.

TIFF (or JPG): Color or grayscale photographs (halftones): always use a minimum of 300

dpi. TIFF (or JPG): Bitmapped line drawings: use a minimum of 1000 dpi.

TIFF (or JPG): Combinations bitmapped line/half-tone (color or grayscale): a minimum of 500 dpi is required.

Please do not:

- Supply files that are optimized for screen use (e.g., GIF, BMP, PICT, WPG); the resolution is too low.
- Supply files that are too low in resolution.
- Submit graphics that are disproportionately large for the content.

Color Artwork

Please make sure that artwork files are in an acceptable format (TIFF (or JPEG), EPS (or PDF), or MS Office files) and with the correct resolution. If, together with your accepted article, you submit usable color figures then Elsevier will ensure, at no additional charge, that these figures will appear in color both on the Web (e.g., ScienceDirect and other sites) and in print at no additional fee to the author. For further information on the preparation of electronic artwork, please see <https://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

Illustration services

Elsevier's Author Services offers Illustration Services to authors preparing to submit a manuscript but concerned about the quality of the images accompanying their article. Elsevier's expert illustrators can produce scientific, technical and medical-style images, as well as a full range of charts, tables and graphs. Image 'polishing' is also available, where our illustrators take your image(s) and improve them to a professional standard. Please visit the website to find out more.

Figure captions

Ensure that each illustration has a caption. A caption should comprise a brief title (**not** on the figure itself) and a description of the illustration. Keep text in the illustrations themselves to a minimum but explain all symbols and abbreviations used.

Tables

Number tables consecutively in accordance with their appearance in the text. Place footnotes to tables below the table body and indicate them with superscript symbols (following symbol hierarchy of asterisk, dagger, double dagger, sectional symbol, etc.) Avoid vertical rules. Be sparing in the use of tables and ensure that the data presented in tables do not duplicate results described elsewhere in the article.

References

Place the reference list in the file after the main text. Number references consecutively in order of their mention in the text; all references must be cited in the text. Personal communications and unpublished data should be cited in the text in parentheses; they should not appear in the reference list.

Citation in text

Please ensure that every reference cited in the text is also present in the reference list (and vice versa). Any references cited in the abstract must be given in full. Unpublished results and personal communications are not recommended in the reference list, but may be mentioned in the text. If these references are included in the reference list they should follow the standard reference style of the journal and should include a substitution of the publication date with either 'Unpublished results' or 'Personal communication'. Citation of a reference as 'in press' implies that the item has been accepted for publication.

Reference links

Increased discoverability of research and high quality peer review are ensured by online links to the sources cited. In order to allow us to create links to abstracting and indexing services, such as Scopus, CrossRef and PubMed, please ensure that data provided in the references are correct. Please note that incorrect surnames, journal/book titles, publication year and pagination may

prevent link creation. When copying references, please be careful as they may already contain errors. Use of the Digital Object Identifier (DOI) is encouraged.

Web references

As a minimum, the full URL should be given and the date when the reference was last accessed. Any further information, if known (DOI, author names, dates, reference to a source publication, etc.), should also be given. Web references can be listed separately (e.g., after the reference list) under a different heading if desired, or can be included in the reference list.

Data references

This journal encourages you to cite underlying or relevant datasets in your manuscript by citing them in your text and including a data reference in your Reference List. Data references should include the following elements: author name(s), dataset title, data repository, version (where available), year, and global persistent identifier. Add [dataset] immediately before the reference so we can properly identify it as a data reference. The [dataset] identifier will not appear in your published article.

Reference management software

Most Elsevier journals have their reference template available in many of the most popular reference management software products. These include all products that support [Citation Style Language styles](#), such as [Mendeley](#). Using citation plug-ins from these products, authors only need to select the appropriate journal template when preparing their article, after which citations and bibliographies will be automatically formatted in the journal's style. If no template is yet available for this journal, please follow the format of the sample references and citations as shown in this Guide. If you use reference management software, please ensure that you remove all field codes before submitting the electronic manuscript. [More information on how to remove field codes from different reference management software](#).

Reference formatting

There are no strict requirements on reference formatting at submission. References can be in any style or format as long as the style is consistent. Where applicable, author(s) name(s), journal title/book title, chapter title/article title, year of publication, volume number/book chapter and the article number or pagination must be present. Use of DOI is highly encouraged. The reference style used by the journal will be applied to the accepted article by Elsevier at the proof stage. Note that missing data will be highlighted at proof stage for the author to correct. If you do wish to format the references yourself they should be arranged according to the following examples:

Reference style

Follow the format of the "Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals" (Ann Intern Med 1997;126:36-47). Use journal abbreviations as listed in the Cumulated Index Medicus.

Text: Indicate references by (consecutive) superscript Arabic numerals in the order in which they appear in the text. The numerals are to be used outside periods and commas, inside colons and semicolons.

List: Number the references in the list in the order in which they appear in the text. Examples

of References (if 6 or fewer authors, list all; if 7 or more, list first 6 and et al.):

Format for Journal Articles:

Steed C, Kelly JW, Blackhurst D, Boeker S, Diller T, Alper P, et al. Hospital hand hygiene opportunities: Where and when (HOW2)? The HOW2 Benchmark Study. Am J Infect Control 2011;39:19-26.

Format for Books:

World Health Organization. World Alliance for Patient Safety. WHO Guidelines on Hand Hygiene in Health Care 2009. Geneva [Switzerland]: WHO Press; 2009.

Format for Chapters:

Weinstein L, Swartz MN. Pathogenic properties of invading microorganisms. In: Sodeman WA Jr, Sodeman WA, editors. Pathologic physiology: mechanisms of disease. Philadelphia: WB Saunders; 1974. p. 457-72.

Dataset

Oguro M, Imahiro S, Saito S, Nakashizuka T. Mortality data for Japanese oak wilt disease and surrounding forest compositions, Mendeley Data, v1; 2015. <http://dx.doi.org/10.17632/xwj98nb39r.1>.

Journal abbreviations source

Journal names should be abbreviated according to the list of title word abbreviations: <http://www.issn.org/2-22661-LTWA-online.php>.

Visual Abstracts

The American Journal of Infection Control has adopted visual abstracts as a dissemination method to spread the scientific research published in our journal. A visual abstract is a visual summary of the information usually found within the abstract portion of an article. Similar to the actual text abstract of a research article, it is meant to convey key findings in a shorter format.

To help you in your efforts, our Infographics editors will send you materials to help you get started: An AJIC PowerPoint template for you to enter your text and icons. Examples of previous AJIC visual abstracts for inspiration. The Visual Abstract Primer by Andrew M. Ibrahim (the creator of visual abstracts) @AndrewMIbrahim.

Below are the steps you will work through:

Put together a draft of the visual abstract including key findings. You will select black and white icons to represent your study background, methods, and results. You will then send the draft to the Infographics editors, who will select similar icons from ImageBank. AJIC has a membership with this icon platform and will purchase all icons for your visual abstract. We will make suggestions and send the abstract back to you for further revisions. Once you are pleased with the version, we will prepare the visual abstract for dissemination via social media platforms. If you're not on Twitter please sign-up and send us your hashtag so you can be part of the dissemination efforts. - <https://help.twitter.com/en/create-twitter-account>.

For further information, please contact Jeanne Brandt, Managing Editor at: jb3948@columbia.edu.

Supplementary material

Supplementary material such as applications, images and sound clips, can be published with your article to enhance it. Submitted supplementary items are published exactly as they are received (Excel or PowerPoint files will appear as such online). Please submit your material together with the article and supply a concise, descriptive caption for each supplementary file. If you wish to make changes to supplementary material during any stage of the process, please make sure to provide an updated file. Do not annotate any corrections on a previous version. Please switch off the 'Track Changes' option in Microsoft Office files as these will appear in the published version.

Research data

This journal encourages and enables you to share data that supports your research publication where appropriate, and enables you to interlink the data with your published articles. Research data refers to the results of observations or experimentation that validate research findings. To facilitate reproducibility and data reuse, this journal also encourages you to share your software, code, models, algorithms, protocols, methods and other useful materials related to the project.

Below are a number of ways in which you can associate data with your article or make a statement about the availability of your data when submitting your manuscript. If you are sharing data in one of these ways, you are encouraged to cite the data in your manuscript and reference list. Please refer to the "References" section for more information about data citation. For more information on depositing, sharing and using research data and other relevant research materials, visit the [research data](#) page.

Data linking

If you have made your research data available in a data repository, you can link your article directly to the dataset. Elsevier collaborates with a number of repositories to link articles on ScienceDirect with relevant repositories, giving readers access to underlying data that gives them a better understanding of the research described.

There are different ways to link your datasets to your article. When available, you can directly link your dataset to your article by providing the relevant information in the submission system. For more information, visit the [database linking page](#).

For [supported data repositories](#) a repository banner will automatically appear next to your published article on ScienceDirect.

In addition, you can link to relevant data or entities through identifiers within the text of your manuscript, using the following format: Database: xxxx (e.g., TAIR: AT1G01020; CCDC: 734053; PDB: 1XFN).

Mendeley Data

This journal supports Mendeley Data, enabling you to deposit any research data (including raw and processed data, video, code, software, algorithms, protocols, and methods) associated with your manuscript in a free-to-use, open access repository. During the submission process, after uploading your manuscript, you will have the opportunity to upload your relevant datasets directly to *Mendeley Data*. The datasets will be listed and directly accessible to readers next to your published article online.

For more information, visit the [Mendeley Data for journals page](#).

Data statement

To foster transparency, we encourage you to state the availability of your data in your submission. This may be a requirement of your funding body or institution. If your data is unavailable to access or unsuitable to post, you will have the opportunity to indicate why during the submission process, for example by stating that the research data is confidential. The statement will appear with your published article on ScienceDirect. For more information, visit the [Data Statement page](#).

AFTER ACCEPTANCE

Proofs

One set of page proofs (as PDF files) will be sent by e-mail to the corresponding author or a link will be provided in the e-mail so that authors can download the files themselves. Elsevier

now provides authors with PDF proofs which can be annotated; for this you will need to download AdobeReader version 7 (or higher) available free from <http://get.adobe.com/reader>. Instructions on how to annotate PDF files will accompany the proofs (also given online). The exact system requirements are given at the Adobe site: <http://www.adobe.com/products/reader/tech-specs.html>.

If you do not wish to use the PDF annotations function, you may list the corrections (including replies to the Query Form) and return them to Elsevier in an e-mail. Please list your corrections quoting line number. If, for any reason, this is not possible, then mark the corrections and any other comments (including replies to the Query Form) on a printout of your proof and return by fax, or scan the pages and e-mail, or by post. Please use this proof only for checking the typesetting, editing, completeness and correctness of the text, tables and figures. Significant changes to the article as accepted for publication will only be considered at this stage with permission from the Editor. We will do everything possible to get your article published quickly and accurately – please let us have all your corrections within 48 hours. It is important to ensure that all corrections are sent back to us in one communication: please check carefully before replying, as inclusion of any subsequent corrections cannot be guaranteed. Proofreading is solely your responsibility. Note that Elsevier may proceed with the publication of your article if no response is received.

Offprints

Paper offprints can be ordered via the offprint order form which is sent once the article is accepted for publication. Both corresponding and co-authors may order offprints at any time via [Elsevier's WebShop](#).

Online Databases

Elsevier will automatically publish all AJIC papers to online scientific databases such as PubMed and Science Direct at the time of print publication.