

Universidade Federal de São Carlos  
Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia

**BRUNA DE ARRUDA LEITE**

**ESTUDO DA SUSCEPTIBILIDADE  
E RESPOSTA DOS BIOFILMES DE ESTAFILOCOCOS  
AOS AGENTES ANTIMICROBIANOS**

São Carlos  
2013

**BRUNA DE ARRUDA LEITE**

**ESTUDO DA SUSCEPTIBILIDADE  
E RESPOSTA DOS BIOFILMES DE ESTAFILOCOCOS  
AOS AGENTES ANTIMICROBIANOS**

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia – Universidade Federal de São Carlos/UFSCar, como parte dos requisitos para a obtenção do título de doutor em Biotecnologia.

Orientadores:

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Elisabeth Loshchagin Pizzolitto

Prof. Dr. Clovis Wesley Oliveira de Souza

São Carlos  
2013

Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da  
Biblioteca Comunitária/UFSCar

L533es Leite, Bruna de Arruda.  
Estudo da susceptibilidade e resposta dos biofilmes de estafilococos aos agentes antimicrobianos / Bruna de Arruda Leite. -- São Carlos : UFSCar, 2013.  
151 f.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2013.

1. Biofilme. 2. *Staphylococcus epidermidis*. 3. *Staphylococcus aureus*. 4. Agentes anti-infecciosos. I. Título.

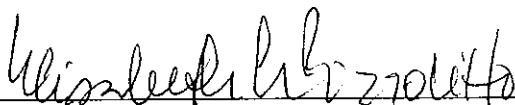
CDD: 576.15 (20<sup>a</sup>)

**Bruna de Arruda Leite**

Tese de Doutorado submetida à  
Coordenação do Programa de Pós-  
Graduação em Biotecnologia, da  
Universidade Federal de São  
Carlos, como requisito parcial para  
a obtenção do título de Doutor em  
Biotecnologia.

**Aprovado em: 10/05/2013**

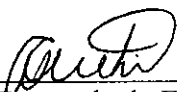
**BANCA EXAMINADORA**



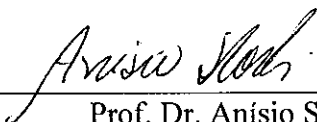
Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Elisabeth Loshchagin Pizzolito (Orientadora)  
(Universidade do Estado de São Paulo "Júlio de Mesquita Filho"/ Araraquara)



Prof. Dr. Fernando M. Araújo-Moreira  
(Universidade Federal de São Carlos)



Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Fernanda de Freitas Aníbal  
(Universidade Federal de São Paulo)



Prof. Dr. Anísio Storti  
(Centro Universitário de Votuporanga)



Prof. Dr. Evandro Watanabe  
(Universidade de São Paulo)

## **Agradecimentos**

**A Deus**, por ter me capacitado para que mais esta etapa fosse concretizada; por ter me enchido de alegria e força em dias que me pareciam escuros e tristes; por me trazer a tua paz em momentos de ansiedade e preocupação...

Deus obrigada porque eis que mais um propósito se cumpre.

**Ao meu marido**, meu companheiro em todas as horas, agradeço por ter caminhado ao meu lado, pela paciência e compreensão, pelo apoio, incentivo e ajuda para vencer os obstáculos, desafios e imprevistos.

**Aos meus pais**, que me ensinaram a viver com dignidade, que se deram por inteiro e, em muitas vezes renunciaram a seus sonhos para a realização do meu; pelo amor, carinho, pelos sorrisos, pelas lágrimas compreendidas e amenizadas, por toda a atenção, dedicação e apoio.

**Ao meu irmão, minha cunhada e a minha família**, pela presença e companhia, por sempre estarem ao meu lado, nunca dispensando carinho e sempre expressando grande amor...  
Por todo o tipo de ajuda e apoio dedicado para que fosse completa a realização desta meta em minha vida.

**Aos meus amigos**, pelo tempo compartilhado, pelo estímulo, carinho e compreensão e, que de alguma forma contribuíram para o êxito desta conquista...  
Juntos, aprendemos, trabalhamos e conquistamos.

**A Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup> Elisabeth Pizzolitto e Prof. Dr. Clovis Oliveira**, meus orientadores, pela disponibilidade, confiança, pelas críticas, correções e sugestões durante a orientação. Obrigada pela atenção, por toda a dedicação, todo o apoio, pela paciência e amizade.

**A Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup> Rosário Oliveira, Pilar Teixeira, Fernanda Gomes e a todos os amigos do laboratório de Microbiologia Aplicada da Universidade do Minho/ Braga, Portugal**, agradeço pela confiança, disponibilidade de aprendizado e a todo conhecimento dedicado na realização desta tese, pela atenção, incentivo e todo apoio; pela amizade, pela força, pelas alegrias compartilhadas e ajuda em dias difíceis.

**Aos funcionários, técnicos e amigos do laboratório de Microbiologia Clínica do NAC- Universidade Estadual Paulista/UNESP, Araraquara,** pela convivência, paciência, e pela contribuição para o êxito deste trabalho.

**Ao laboratório de Epidemiologia Molecular, departamento de Medicina Veterinária Preventiva/ UNESP, Jaboticabal, em especial a Poliana e Camila,** pelo aprendizado, conhecimento e ajuda para o desenvolvimento de técnicas moleculares.

**A todos os professores e funcionários do Programa de Pós Graduação em Biotecnologia – UFSCar, São Carlos,** pelo apoio, conhecimento, ajuda e incentivo dedicado no decorrer deste trabalho e, em especial a secretária Cláudia Pastega por toda atenção, ajuda e amizade.

**A bolsa concedida pela União Européia/ ISAC,** no âmbito do Programa Erasmus Mundus External Cooperation Window, que visa à mobilidade entre a Europa e o Brasil, possibilitando realizar parte do meu doutorado na Universidade do Minho, Braga/ Portugal.

**A CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior),** pela concessão da bolsa durante os três últimos anos do doutorado, sem a qual não teria sido possível a minha dedicação total ao presente trabalho.

Agradeço a todos que contribuíram de alguma forma direta ou indiretamente para a realização deste trabalho.

Muito Obrigada!!!

**‘Nas grandes batalhas da vida, o primeiro passo para a vitória é o desejo de vencer ’’**

*Mahatma Gandhi*

## RESUMO

LEITE, B.A. **Estudo da susceptibilidade e resposta dos biofilmes de estafilococos aos agentes antimicrobianos**. 2013. 151 f. Tese de Doutorado. Programa de Pós Graduação em Biotecnologia/ UFSCar, São Carlos/SP, Brasil.

Os estafilococos pertencem a um grupo diversificado de bactérias que causam doenças que vão desde infecções de pele, a risco de morte como bacteriemia. Os dois principais patógenos oportunistas deste gênero, *Staphylococcus epidermidis* e *S. aureus* são as causas mais frequentes de infecções nosocomiais e infecções associadas ao uso de dispositivos médicos. Estafilococos é a principal causa de infecções associadas com a formação de biofilme. As infecções relacionadas à formação de biofilme são difíceis de tratar com agentes antimicrobianos convencionais, limitando a eficácia da terapia com antibióticos e tornando um problema crucial para o tratamento de infecções crônicas. Portanto, o objetivo principal desta tese foi estudar a susceptibilidade das células de estafilococos em biofilme contra agentes antimicrobianos. Para isso, foram avaliadas as atividades *in vitro* de N-acetilcisteína (NAC), rifampicina, linezolida, daptomicina e vancomicina isoladamente e em combinação contra as células em biofilme de *Staphylococcus epidermidis* e *S. aureus*. As atividades dos agentes antimicrobianos foram avaliadas nas concentrações CIM, 10xCIM e a concentração máxima no soro. A susceptibilidade dos biofilmes para os agentes estudados foi avaliada através de unidades formadoras de colônia (UFC/ml), a coloração com cristal violeta (CV), que é a medida da biomassa total do biofilme e, a atividade celular usando ensaio de redução de XTT. Os resultados das células viáveis (expressos em  $\log_{10}$  UFC/ml) para N-acetilcisteína sozinho, na concentração 10xCIM para ambos os biofilmes de estafilococos avaliados mostraram um maior efeito em comparação com outros agentes antimicrobianos avaliados, com redução de cerca de 4-5  $\log_{10}$ . A combinação de NAC (10xCIM) - vancomicina (independente da concentração avaliada) mostrou uma maior redução ( $p < 0,05$ ) em células viáveis de *S. epidermidis* e *S. aureus*, em comparação com as outras combinações avaliadas. Esta combinação apresentou uma redução de cerca de 5-6  $\log_{10}$  CFU/ml. Os resultados de CV mostraram perda da biomassa total do biofilme e, foram observados diminuição da atividade metabólica, medida pelo ensaio de XTT, este resultados estão em boa concordância com os resultados obtidos em termos de viabilidade celular. Em conclusão, os resultados obtidos nos estudos desta tese constituem uma estratégia terapêutica promissora para o tratamento de infecções associadas a formação de biofilme por *S. epidermidis* e *S. aureus*. Além disso, a utilização de agentes antimicrobianos em combinação pode ser uma alternativa para a monoterapia, evitando assim o desenvolvimento de resistência.

**Palavras-chave:** Biofilme, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus*, agentes antimicrobianos.



## ABSTRACT

LEITE, B.A. **Study of susceptibility and response of staphylococcal biofilms to antimicrobial agents.** 2013. 151 f. Doctoral Thesis. Postgraduate Program in Biotechnology/UFSCar, São Carlos/SP, Brazil.

The staphylococci belong a diverse group of bacteria that cause diseases ranging from minor skin infections to death-threatening bacteraemia. The two major opportunistic pathogens of this genus, *Staphylococcus epidermidis* and *S. aureus* are the most frequent causes of nosocomial infections and infections associated with the use of medical devices. Staphylococci, is the leading cause of infections associated with biofilm formation. Biofilm-related infections are challenging to treat with conventional antimicrobial agents, limiting the efficacy of antibiotic therapy and becoming a crucial problem for treatment of chronic infections. Therefore, the main aim of this thesis was to study the susceptibility of staphylococcal biofilm cells against antimicrobial agents. For that, it was evaluated *in vitro* activities of N-acetylcysteine (NAC), rifampicin, linezolid, daptomycin and vancomycin alone and in combination on biofilm cells of *Staphylococcus epidermidis* and *S. aureus*. The activities of antimicrobial agents were evaluated in concentrations CIM, 10xCIM and peak serum. The biofilms susceptibility to agents studied was assessed through, colony-forming units (CFU/ml), staining with crystal violet (CV) that is the measure total biofilm biomass and cellular activity using XTT reduction assay. The results of viable cells (expressed as log<sub>10</sub> CFU/ml) to N-acetylcysteine alone, in the concentration 10xCIM on both the biofilms of staphylococcal evaluated showed a greater effect compared with other antimicrobial agents evaluated, with reductions of approximately 4-5 log<sub>10</sub>. The combination NAC (10xCIM) - vancomycin (independent of concentration evaluated) showed a greater reduction (p<0.05) on viable cells of *S. epidermidis* and *S. aureus*, compared with other combinations evaluated. This combination presented a reduction about of 5-6 log<sub>10</sub> CFU/ml. The results of CV showed loss the total biofilm biomass and were observed decrease in the metabolic activity measured by the XTT, these results are in very good agreement with those obtained in terms of cell viability. In conclusion, the results obtained in the studies of this thesis constitutes a promising therapeutic strategy in the treatment of infections associated with biofilm formation by *S. epidermidis* and *S. aureus*. In addition, the use of antimicrobial agents in combinations may be an alternative for monotherapy, thus avoiding the development of resistance.

**Keywords:** Biofilm, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus*, antimicrobial agents.

# Sumário

## Capítulo I- Introdução e Proposição

<b>1. Introdução</b>	20
1.1 <i>Staphylococcus</i> spp.	21
1.1.1 <i>Staphylococcus epidermidis</i> e <i>Staphylococcus aureus</i>	22
1.2 Biofilme microbiano	24
1.2.1 História	24
1.2.2 Definição	27
1.2.3 Estrutura e forma	27
1.2.4 Etapas de desenvolvimento do biofilme de estafilococos	30
1.2.5 Fatores envolvidos na formação do biofilme de estafilococos	32
1.2.5.1 Adesina polissacarídica capsular (PSA)	33
1.2.5.2 Adesina polissacarídica intercelular (PIA)	33
1.2.5.3 Proteínas de superfície estafilocócica	34
1.2.5.4 Adesão intercelular pelo gene	35
1.3 Resistência estafilocócica aos agentes antimicrobianos	36
1.4 Agentes farmacológicos	42
1.4.1 N-acetilcisteína (NAC)	42
1.4.2 Rifampicina	44
1.4.3 Linezolida	45
1.4.4 Daptomicina	46
1.4.5 Vancomicina	47
<b>1.5 Objetivo</b>	49
1.5.1 Geral	49

1.5.2 Específico	49
------------------	----

## Capítulo II- Desenvolvimento

<b>2. Desenvolvimento- Material e Métodos</b>	<b>52</b>
2.1 Isolados clínicos de <i>Staphylococcus epidermidis</i> e <i>S. aureus</i>	53
2.2 Agentes farmacológicos avaliados	54
2.3 Cepas bacterianas- condições de armazenamento	54
2.4 Preparo da suspensão bacteriana	54
2.5 Ágar vermelho	55
2.6 Detecção do gene <i>icaD</i>	56
2.6.1 Extração do DNA- Kit RTP® Bactéria DNA mini Kit (250) (Invitek)	56
2.6.2 Reação em cadeia da polimerase (PCR) - Operon <i>icaD</i>	58
2.7 Concentração inibitória mínima (CIM)	58
2.8 Determinação CIM – E-test	59
2.9 Efeito pós-antibiótico (PAE)	60
2.10 Efeito dos agentes farmacológicos sobre as células em biofilme	61
2.10.1 Unidades formadoras de colônia (UFC)	62
2.10.2 Método colorimétrico- XTT	64
2.10.3 Cristal violeta (CV)	65
2.11 Extração da matriz do biofilme com resina de permuta catiônica	65
2.11.1 Quantificação de proteínas	66
2.11.2 Quantificação de polissacarídeos totais	67
2.12 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)	67
2.13 Efeito dos agentes farmacológicos sobre as células planctônicas	68
2.13.1 Unidades formadoras de colônia (UFC)	69

2.13.2 Método colorimétrico- XTT	70
2.14 Análise estatística	70

### Capítulo III- Resultados

<b>3. Resultados</b>	72
3.1 Isolados clínicos de <i>S. epidermidis</i> e <i>S. aureus</i>	72
3.1.1 Agar vermelho Congo	72
3.1.2 Detecção do gene <i>icaD</i>	73
3.2 Agentes farmacológicos avaliados sozinhos	74
3.2.1 N-acetilcisteína (NAC)	74
3.2.1.1 Concentração inibitória mínima (CIM)	74
3.2.1.2 Efeito do NAC sobre as células de estafilococos em biofilme	75
3.2.1.2.1 Unidades formadoras de colônia (UFC)	75
3.2.1.2.2 Método colorimétrico- XTT	76
3.2.1.2.3 Cristal violeta (CV)	77
3.2.1.3 Extração da matriz do biofilme	78
3.2.1.4 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)	79
3.2.1.5 Efeito do NAC sobre as células planctônicas de <i>S. epidermidis</i>	81
3.2.1.5.1 Unidades formadoras de colônia (UFC)	81
3.2.1.5.2 Método colorimétrico- XTT	82
3.2.2 Rifampicina	83
3.2.2.1 Concentração inibitória mínima (CIM)	83
3.2.2.2 Efeito pós-antibiótico (PAE)	83
3.2.2.3 Efeito da rifampicina sobre as células de <i>S. epidermidis</i> em biofilme	84
3.2.2.3.1 Unidades formadoras de colônia (UFC)	84

3.2.2.3.2 Método colorimétrico- XTT	85
3.2.2.3.3 Cristal violeta (CV)	85
3.2.2.4 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)	86
3.2.3 Linezolida	89
3.2.3.1 Concentração inibitória mínima (CIM)	89
3.2.3.2 Efeito do linezolida sobre as células de <i>S. epidermidis</i> em biofilme	89
3.2.3.2.1 Unidades formadoras de colônia (UFC)	89
3.2.3.2.2 Método colorimétrico- XTT	90
3.2.3.2.3 Cristal violeta (CV)	91
3.2.4 Daptomicina	93
3.2.4.1 Concentração inibitória mínima (CIM)	93
3.2.4.2 Efeito da daptomicina sobre as células de <i>S. epidermidis</i> em biofilme	93
3.2.4.2.1 Unidades formadoras de colônia (UFC)	93
3.2.4.2.2 Método colorimétrico- XTT	94
3.2.4.2.3 Cristal violeta (CV)	95
3.2.5 Vancomicina	97
3.2.5.1 Determinação CIM- E-test	97
3.2.5.2 Efeito da vancomicina sobre as células de estafilococos em biofilme	98
3.2.5.2.1 Unidades formadoras de colônia (UFC)	98
3.3 Agentes farmacológicos avaliados em combinação	100
3.3.1 N-acetilcisteína (NAC) com rifampicina	100
3.3.1.1 Efeito do NAC com rifampicina sobre as células de <i>S. epidermidis</i> em biofilme	100
3.3.1.1.1 Unidades formadoras de colônia (UFC)	100
3.3.1.1.2 Método colorimétrico- XTT	101
3.3.1.1.3 Cristal violeta (CV)	101

3.3.1.2 Extração da matriz do biofilme	102
3.3.1.3 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)	103
3.3.1.4 Efeito do NAC com rifampicina sobre as células planctônicas de <i>S. epidermidis</i>	105
3.3.1.4.1 Unidades formadoras de colônia (UFC)	105
3.3.1.4.2 Método colorimétrico- XTT	106
3.3.2 N-acetilcisteína (NAC) com linezolida	107
3.3.2.1 Efeito do NAC com linezolida sobre as células de <i>S. epidermidis</i> em biofilme	107
3.3.2.1.1 Unidades formadoras de colônia (UFC)	107
3.3.2.1.2 Método colorimétrico- XTT	108
3.3.2.1.3 Cristal violeta (CV)	109
3.3.3 N-acetilcisteína (NAC) com vancomicina	110
3.3.3.1 Efeito do NAC com vancomicina sobre as células de estafilococos em biofilme	110
3.3.3.1.1 Unidades formadoras de colônia (UFC)	110

## **Capítulo IV- Discussão e Conclusão**

<b>4. Discussão e Conclusão</b>	113
4.1 Discussão	113
4.2 Conclusão	121

## **Capítulo V- Referências Bibliográficas**

<b>5. Referências Bibliográficas</b>	124
--------------------------------------	-----

## **Anexos- Produções Científicas**

<b>Anexos- Produções Científicas</b>	145
<b>Artigos Científicos</b>	145
<b>Anexo A</b> - N-acetylcysteine and vancomycin alone and in combination against staphylococci biofilm	145
<b>Anexo B</b> - <i>In vitro</i> activity of daptomycin, linezolid and rifampicin on <i>Staphylococcus epidermidis</i> biofilms	146
<b>Anexo C</b> - <i>S. epidermidis</i> biofilms control by N-acetylcysteine (NAC) and rifampicin	147
<b>Anexo D</b> - Combined effect of linezolid and N-acetylcysteine against <i>Staphylococcus epidermidis</i> biofilms	148
<b>Anais de Eventos</b>	149
<b>Anexo E</b> - Treatment of <i>Staphylococcus epidermidis</i> biofilms associated the osteomyelitis by vancomycin and N-acetylcysteine in combination	149
<b>Anexo F</b> - Treatment antimicrobial by vancomycin and N-acetylcysteine in combination on Staphylococci biofilms.	150
<b>Anexo G</b> - Effect of N-Acetylcysteine alone and in combination with rifampicin on <i>Staphylococcus epidermidis</i> biofilms	151

## Lista de Tabelas

<b>Tabela 1</b> - Identificação laboratorial dos estafilococos	53
<b>Tabela 2</b> - Produção de <i>slime</i> das cepas de estafilococos observado por meio do método agar vermelho Congo	72
<b>Tabela 3</b> - Concentrações inibitórias mínimas do NAC nas cepas de <i>S. epidermidis</i> e <i>S. aureus</i>	74
<b>Tabela 4</b> - Concentrações inibitórias mínimas da rifampicina nas cepas de <i>S. epidermidis</i>	83
<b>Tabela 5</b> - PAE da rifampicina expresso após contato com células de <i>S. epidermidis</i>	83
<b>Tabela 6</b> - Concentrações inibitórias mínimas do linezolida nas cepas de <i>S. epidermidis</i>	89
<b>Tabela 7</b> - Concentrações inibitórias mínimas da daptomicina nas cepas de <i>S. epidermidis</i>	93
<b>Tabela 8</b> - E-test da vancomicina nas cepas de estafilococos	97



## Lista de Figuras

<b>Figura 1</b> - Estafilococos após a coloração por técnica de Gram	21
<b>Figura 2</b> – Lentes usadas por Antonie Van Leeuwenhoek	24
<b>Figura 3</b> - Microscopia confocal a laser de um corte sagital de um biofilme no ambiente, mostrando os grupos celulares e canais de água	28
<b>Figura 4</b> - Micrografia eletrônica de varredura de um biofilme misto, sobre uma superfície metálica de um reator de laboratório	29
<b>Figura 5</b> - Etapas da formação de um biofilme de estafilococos	32
<b>Figura 6</b> - Determinação CIM E-test	60
<b>Figura 7</b> - Diluição seriada da amostra em NaCl	63
<b>Figura 8</b> - Unidades formadoras de colônia (UFC/ml)	64
<b>Figura 9</b> - Produção de <i>slime</i> (A) por estafilococos e, <i>slime</i> negativo (B)	73
<b>Figura 10</b> - Detecção do gene <i>icaD</i> nos isolados de <i>S. epidermidis</i> e <i>S. aureus</i>	73
<b>Figura 11</b> - Efeito do NAC nas concentrações CIM e 10xCIM sobre as células em biofilme de <i>S. epidermidis</i>	75
<b>Figura 12</b> - Efeito do NAC nas concentrações CIM e 10xCIM sobre as células em biofilme de <i>S. aureus</i>	75
<b>Figura 13</b> - Atividade celular expressa pelo XTT após tratamento com NAC (CIM e 10xCIM) sobre células em biofilme de <i>S. epidermidis</i>	76
<b>Figura 14</b> - Atividade celular expressa pelo XTT após tratamento com NAC (CIM e 10xCIM) sobre células em biofilme de <i>S. aureus</i>	77
<b>Figura 15</b> - Biomassa total após tratamento com NAC (CIM e 10xCIM) sobre células em biofilme de <i>S. epidermidis</i>	78
<b>Figura 16</b> - Quantificação de proteínas (A) e polissacarídeos (B) da matriz dos biofilmes de <i>S. epidermidis</i> após tratamento com NAC (CIM e 10xCIM)	78
<b>Figura 17</b> - Micrografias eletrônicas de varreduras (MEV) do biofilme de <i>S. epidermidis</i> (1457): Controle positivo (A), após tratamento com NAC CIM (B) e NAC 10xCIM (C). A barra nas imagens correspondem a 5 µm. (Leica Cambridge S-360)	80

<b>Figura 18</b> - Efeito do NAC nas concentrações CIM e 10xCIM sobre as células planctônicas de <i>S. epidermidis</i>	81
<b>Figura 19</b> - Atividade celular expressa pelo XTT após tratamento com NAC (CIM e 10xCIM) sobre células planctônicas de <i>S. epidermidis</i>	82
<b>Figura 20</b> - Efeito da rifampicina (RIF) na concentração CIM e concentração máxima no soro (Cmax) sobre as células em biofilme de <i>S. epidermidis</i>	84
<b>Figura 21</b> - Atividade celular expressa pelo XTT após tratamento com rifampicina (RIF) na concentração CIM e concentração máxima no soro (Cmax) sobre células em biofilme de <i>S. epidermidis</i>	85
<b>Figura 22</b> - Biomassa total após tratamento com rifampicina (RIF) na concentração CIM e na concentração máxima no soro (Cmax) sobre células em biofilme de <i>S. epidermidis</i>	86
<b>Figura 23</b> - Micrografias eletrônicas de varreduras (MEV) do biofilme de <i>S. epidermidis</i> (1457): Controle positivo (A), após tratamento com rifampicina na concentração máxima no soro (B). A barra nas imagens correspondem a 5 µm. (Leica Cambridge S-360)	87
<b>Figura 24</b> - Efeito do linezolida (LIN) na concentração CIM e na concentração máxima no soro (Cmax) sobre as células em biofilme de <i>S. epidermidis</i> (9142 e 1457)	90
<b>Figura 25</b> - Atividade celular expressa pelo XTT após tratamento com linezolida (LIN) na concentração CIM e na concentração máxima no soro (Cmax) sobre células em biofilme de <i>S. epidermidis</i>	91
<b>Figura 26</b> - Biomassa total após tratamento com linezolida (LIN) na concentração CIM e na concentração máxima no soro (Cmax) sobre células em biofilme de <i>S. epidermidis</i>	92
<b>Figura 27</b> - Efeito da daptomicina (DAP) na concentração CIM e na concentração máxima no soro (Cmax) sobre as células em biofilme de <i>S. epidermidis</i>	94
<b>Figura 28</b> - Atividade celular expressa pelo XTT após tratamento com daptomicina (DAP) na concentração CIM e na concentração sérica máxima (Cmax) sobre células em biofilme de <i>S. epidermidis</i>	95
<b>Figura 29</b> - Biomassa total após tratamento com daptomicina (DAP) na concentração CIM e na concentração máxima no soro (Cmax) sobre células em biofilme de <i>S. epidermidis</i>	96
<b>Figura 30</b> - E-test da vancomicina sobre células de <i>S. epidermidis</i> (A) e <i>S. aureus</i> (B)	98
<b>Figura 31</b> - Efeito da vancomicina (VAN) na concentração CIM e na concentração máxima no soro (Cmax) sobre as células em biofilme de <i>S. epidermidis</i>	99

<b>Figura 32</b> - Efeito da vancomicina (VAN) na concentração CIM e na concentração máxima no soro (Cmax) sobre as células em biofilme de <i>S. aureus</i>	99
<b>Figura 33</b> - Efeito do NAC (CIM e 10xCIM) combinado com rifampicina (RIF) na concentração máxima no soro (Cmax) sobre as células em biofilme de <i>S. epidermidis</i>	100
<b>Figura 34</b> - Atividade celular expressa pelo XTT após tratamento com NAC (CIM e 10xCIM) combinado com rifampicina (RIF) na concentração máxima no soro (Cmax) sobre células em biofilme de <i>S. epidermidis</i>	101
<b>Figura 35</b> - Biomassa total após tratamento com NAC (CIM e 10xCIM) combinado com rifampicina (RIF) na concentração máxima no soro (Cmax) sobre células em biofilme de <i>S. epidermidis</i>	102
<b>Figura 36</b> - Figura 46. Quantificação de proteínas (A) e polissacarídeos (B) da matriz dos biofilmes de <i>S. epidermidis</i> após tratamento com NAC (CIM e 10xCIM) combinado com rifampicina (RIF) na concentração máxima no soro (Cmax)	103
<b>Figura 37</b> - Micrografias eletrônicas de varreduras (MEV) do biofilme de <i>S. epidermidis</i> (1457): Controle positivo (A), após tratamento com NAC (CIM) combinado com rifampicina na concentração máxima no soro (Cmax) (B) e NAC (10xCIM) combinado com rifampicina (Cmax) (C). A barra nas imagens correspondem a 5 µm. (Leica Cambridge S-360)	104
<b>Figura 38</b> - Efeito do NAC (CIM e 10xCIM) combinado com rifampicina (RIF) na concentração máxima no soro (Cmax) sobre as células planctônicas de <i>S. epidermidis</i>	105
<b>Figura 39</b> - Atividade celular expressa pelo XTT após tratamento com NAC (CIM e 10xCIM) combinado com rifampicina (RIF) na concentração máxima no soro (Cmax) sobre células planctônicas de <i>S. epidermidis</i>	106
<b>Figura 40</b> - Efeito do NAC em combinação com linezolida (LIN) nas concentrações CIM, 10xCIM e na concentração máxima no soro (Cmax) sobre as células em biofilme de <i>S. epidermidis</i>	107
<b>Figura 41</b> - Atividade celular expressa pelo XTT após tratamento com NAC em combinação com linezolida (LIN) nas concentrações CIM, 10xCIM e concentração máxima no soro (Cmax) sobre as células em biofilme de <i>S. epidermidis</i>	108
<b>Figura 42</b> - Biomassa total após tratamento com NAC em combinação com linezolida (LIN) nas concentrações CIM, 10xCIM e na concentração máxima no soro (Cmax) sobre as células em biofilme de <i>S. epidermidis</i>	109
<b>Figura 43</b> - Efeito do NAC combinado com vancomicina (VAN) nas concentrações CIM, 10xCIM e concentração máxima no soro (Cmax) sobre as células em biofilme de <i>S. epidermidis</i>	110

**Figura 44** - Efeito do NAC combinado com vancomicina (VAN) nas concentrações CIM, 10xCIM e concentração máxima no soro (Cmax) sobre as células em biofilme de *S. aureus* 111

# **Capítulo I**

## **Introdução e Objetivo**

## 1. Introdução

Os estafilococos são os principais agentes etiológicos que causam infecções em superfícies bióticas e abióticas (QU et al., 2010). Dentre as espécies de estafilococos, destacam-se *Staphylococcus epidermidis* e *S. aureus* como isolados mais frequentes das infecções (OTTO, 2008). Estas infecções são diversas e incluem, conjuntivite, otite externa, osteomielite, infecções em cateteres, próteses articulares e válvulas cardíacas ( HALL-STOODLEY; COSTERTON; STOODLEY, 2004; FUX et al., 2005) .

A virulência dos estafilococos é principalmente devido à sua capacidade de formar biofilme. As células em biofilme são mais resistentes aos antibióticos e, resistem as respostas do hospedeiro, comparado com as células planctônicas (PARRA-RUIZ et al., 2010; QU et al., 2010).

Os testes de susceptibilidade aos antibióticos convencionais concebidos para bactérias planctônicas, como o MIC (concentração inibitória mínima) são usados para guiar o tratamento de infecções relacionadas com a formação de biofilme (CERI et al., 2001). Numerosos estudos têm sido realizados para comparar a susceptibilidade dos antibióticos contra as células em biofilme e células planctônicas. A maioria dos estudos descobriram que as células bacterianas em biofilme foram 100-1000 vezes mais resistentes a ação dos antibióticos comparadas com as células planctônicas. (CERI et al., 1999; CERI et al., 2001; SPOERING; LEWIS, 2001; AARON et al., 2002; CERCA et al., 2005).

Estafilococos são as bactérias mais frequentes causadoras das infecções e, frequentemente não é possível o tratamento das infecções sem a remoção dos implantes infectados, destacando-se a necessidade de novos agentes antimicrobianos ou estratégias para o tratamento de infecções associadas à formação de biofilme (FALAGAS et al., 2009; PARRA-RUIZ et al., 2010).

### 1.1 *Staphylococcus* spp.

O gênero estafilococos, é composto por mais de 37 espécies diferentes, das quais 17 já foram isoladas de amostras biológicas humanas. Todas as espécies fazem parte da microbiota normal da pele e das membranas mucosas de humanos e animais. Os estafilococos são um gênero de bactérias com forma esférica (cocos), cerca de 0,5 a 1,5 micrômetro de diâmetro e formam grupos com aspecto de cachos de uva. Após coloração por técnica de Gram, adquirem cor arroxeada ao microscópio óptico, denominadas de gram-positivas (Figura 1), devido a sua membrana simples e parede celular de peptidoglicano constituída de mureína, ácido tecóico e polissacarídeos (MURRAY, 2004).

Os estafilococos são anaeróbicos facultativos, podendo viver em meios aeróbios, usando oxigênio, ou anaeróbios, por meio de fermentação, e possuem crescimento mais rápido em aerobiose. Os estafilococos não tem flagelo, sendo incapazes de se locomover. Sua temperatura ótima de crescimento é de 30-37°C, a mesma do corpo humano (KLOSS; BANNERMAN, 1999; TOROK; DAY, 2005).

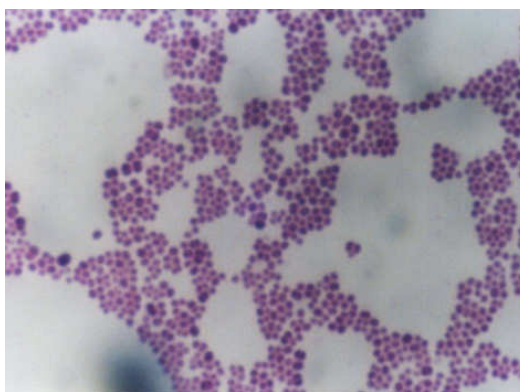


Figura 1 – Estafilococos após a coloração por técnica de Gram (<http://juliasarabioifes.files.wordpress.com/2011/04/c-estafilococos-01.jpg>)

Dentre as espécies de estafilococos, *Staphylococcus aureus* é o patógeno mais importante, causando várias infecções. As outras espécies de estafilococos, geralmente não são patogênicas, com exceção do *S. epidermidis*, que pode provocar bacteremia e infecções relacionadas a dispositivos artificiais e, *S. saprophyticus*, que pode causar infecção do trato urinário (VUONG; OTTO, 2002; TOROK; DAY, 2005; OTTO, 2008).

### **1.1.1 *Staphylococcus epidermidis* e *Staphylococcus aureus***

*S. epidermidis* é membro da microbiota normal da pele e mucosas de humanos e, é considerada uma bactéria oportunista, provocando infecções em indivíduos imunocomprometidos e, em indivíduos saudáveis, por exemplo, por meio de dispositivos artificiais (VADYVALLO; OTTO, 2005; OTTO, 2008).

Com a crescente utilização de implantes, *S. epidermidis* tem sido isolada nas infecções relacionadas aos dispositivos artificiais. A infecção geralmente ocorre em ambientes hospitalares, durante tratamentos e intervenções cirúrgicas, onde são utilizados cateteres e implantes. A contaminação destes dispositivos geralmente ocorre no ato cirúrgico, por bactérias da própria pele e mucosas do paciente, ou, até mesmo, do pessoal do atendimento médico (ARCIOLA et al., 2005; TRABULSI; ALTERNATHUM, 2005; VADYVALLO; OTTO, 2005; PRESTERL et al., 2009; FEY, 2010). Dentre as infecções causadas por *S. epidermidis*, incluem, bacteremias, sepses, endocardites, meningites, endoftalmites, osteomielites, infecções do trato urinário e várias outras, dependendo da localização do implante (CRAMTON; GOTZ, 2004).

*S. epidermidis* tem uma afinidade especial em aderir e formar biofilme sobre as superfícies de implantes biomédicos, com caráter hidrofóbico (FOSTER; HOOK, 1998; JOH et al., 1999; GOTZ; PETERS, 2000; SMELTZER; GILLASPY, 2000).



*S. aureus* faz parte da microbiota residente ou transitória dos seres humanos, principalmente da pele e mucosa das fossas nasais, orofaringe e intestino (BHATIA; ZAHOOR, 2007). São considerados patógenos humanos e frequentemente estão associados as infecções, podendo causar infecções de pele e tecido moles, pneumonias, bacteremias, endocardites, meningites e abscessos (KONEMAN et al., 2001; FOWLER et al., 2005; ZULUAGA et al., 2006). *S. aureus* embora seja uma bactéria da microbiota normal de humanos, também esta associado com infecções relacionadas aos dispositivos artificiais (CRAMTON; GOTZ, 2004).

O potencial patogênico do *S. epidermidis* e *S. aureus* associado as próteses e outros dispositivos biomédicos, esta diretamente relacionada com a capacidade dessas bactérias formarem biofilmes nessas superfícies. As infecções ocasionadas por biofilmes de estafilococos foram encontrados em associação com cateteres urinários, lentes de contato, prótese vascular, dentre outros ( COSTERTON, 2004; BOLES; HORSWILL, 2011). Dentre os gêneros de estafilococos, *S. epidermidis* e *S. aureus* são as bactérias mais isoladas das infecções relacionadas a formação de biofilmes (BOLES; HORSWILL, 2011; CRAMTON; GOTZ, 2004).

As infecções relacionadas com a formação de biofilme por *S. aureus* são semelhantes as infecções com *S. epidermidis*, no entanto, o envolvimento de *S. aureus* geralmente requer cuidados mais intensivos. Muitas vezes, os biofilmes de *S. aureus* associados as infecções são difíceis de tratar com os antibióticos convencionais e, os dispositivos precisam ser substituídos com mais frequência do que os infectados com *S. epidermidis* (JONES et al., 2001). As células de *S. aureus* em biofilme são geneticamente diferentes das células planctônicas, deste modo podem desenvolver um comportamento mais agressivo quando livres e espalhadas dentro do corpo (OTTO, 2008).

## 1.2 Biofilme microbiano

### 1.2.1 História

O desenvolvimento do conceito biofilme foi um processo gradual, composto de muitas e pequenas percepções no ambiente clínico e na natureza.

Antonie Van Leeuwenhoek foi um holandês simples e, muito curioso por natureza, comerciante de tecidos, que no século XVII usou lentes (Figura 2) para tecidos delicados para examinar os "animálculos" existentes nos próprios dentes (COSTERTON; GEESEY; CHENG, 1978).

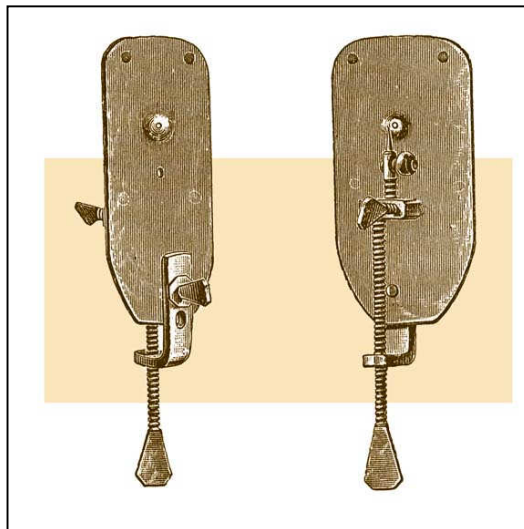


Figura 2 – Lentes usadas por Antonie Van Leeuwenhoek  
(<http://misteriosdomundo.com/como-a-celula-foi-descoberta>)

Henrici (1933) observou um revestimento fino de bactérias no vidro de aquários, com vários tipos de águas obtidas de diversos lagos. Em todos os casos os resultados foram os mesmos, observou o depósito de bactérias sobre a superfície que, tornava-se aparente em alguns dias e aumentava progressivamente, tornando-se tão denso que as células individuais

eram distinguidas com dificuldade. As bactérias aderiam firmemente a superfície de vidro e, não eram removidas por lavagem com água.

Zobell (1943) em seu experimento com suspensão celular em garrafa de vidro, observou que as bactérias localizavam-se em maior número aderidas na superfície interna da garrafa do que no líquido dentro dela. Os estudos de Marshall, Stout e Mitchell (1971), confirmam a sugestão de Zobell, onde observaram no ambiente marinho que a bactéria *Pseudomonas aeruginosa* foram inicialmente atraídas para uma superfície de vidro, e, depois de várias horas, tornaram-se firmemente aderidas a esta superfície. Estas fases foram definidas inicialmente como adesão reversível, observada por uma atração instantânea de bactérias a uma superfície. No entanto, essas bactérias eram fracamente aderidas a esta superfície, sendo fácil sua remoção da superfície por lavagem com NaCl (2,5%). A segunda fase definida como adesão irreversível envolveu uma aderência firme de bactérias à superfície, onde não eram removidas por lavagem com NaCl (2,5%).

A universalidade da formação do biofilme não foi percebida até os primeiros métodos quantitativos. Geesey et al. (1977), analisaram sobre a superfície de rochas em lagos e riachos a presença de numerosas células microbianas sésseis, por meio de microscopia de contraste de fase e, utilizaram uma técnica de coloração de laranja de acridina para realizarem a contagem de bactérias em biofilme.

Costerton, Geesey e Cheng (1978), mostraram a formação de biofilme nas superfícies das pedras das águas geladas do Bugaboo Creek (Canadá). Observaram que as superfícies das pedras estavam cobertas com um lodo claro e escorregadio devido a aderência de bactérias a essas superfícies. Mostraram que as bactérias encontravam-se em maior quantidade aderidas nas superfícies do que livres. As bactérias aderidas estavam envolvidas em uma matriz extracelular e mostraram-se profundamente diferente do seu estado planctônico. Os dados em que esta teoria se baseia veio das observações microscópicas diretas e técnicas quantitativas.

Boivin e Costerton (1991), mostraram que bactérias planctônicas não causam nenhum efeito de corrosão sobre as superfícies metálicas, enquanto que as bactérias em biofilme são capazes de alterar a superfície metálica e levar a corrosão. Atualmente o controle da corrosão sobre superfície metálica é baseado na detecção e controle do biofilme microbiano.

Na clínica, Costerton, Geesey e Cheng. (1978), observaram que as bactérias em biofilme apresentaram um grau notável de resistência aos fatores de defesa do hospedeiro.

Christensen et al. (1982) avaliaram cepas de *S. epidermidis* isoladas das infecções associadas ao uso de cateteres intravasculares. Observaram que as cepas de estafilococos formavam um filme viscoso no interior do cateter, cultivados em meio líquido de TSB (*Tryptic Soy broth*). A microscopia eletrônica de varredura mostrou bactérias aderidas a superfície do cateter.

Christensen et al. (1985) relataram mais tarde a formação de biofilme *in vitro* por cepas de estafilococos. Os estafilococos avaliados foram isolados de infecções associadas ao uso de cateter e endocardite. As bactérias foram cultivadas em um meio rico e as células sésseis foram marcadas com cristal violeta ou safranina em placas de microtitulação e submetidas a leituras de densidade óptica (DO). Observaram que as cepas isoladas das infecções tendem a formar biofilmes e que as células de *S. epidermidis* foram as cepas mais isoladas nas infecções relacionadas a formação de biofilme.

Conforme descrito por vários autores (COSTERTON; IRVIN; CHENG, 1981; REID et al., 1985; COSTERTON et al., 1987) o exame direto de materiais humanos por uma variedade de infecções, mostraram que as infecções estavam associadas a formação de biofilme nos tecidos humanos e dispositivos implantáveis. Observaram que as infecções sobre os dispositivos artificiais persistiam mesmo após a administração de antibióticos. Concluíram, que as células bacterianas dentro de seus bem desenvolvidos biofilmes são resistentes aos agentes antimicrobianos (COSTERTON; GESSEY; CHENG, 1978; NICKEL et al., 1985).

A percepção central dos autores era de que as bactérias envolvidas tinham uma estratégia muito eficiente, formar biofilme sobre superfícies e obter nutrientes por absorção presentes no fluxo ou fluido. Concluíram que as células em biofilme apresentam enormes vantagens, comparadas com as células planctônicas (COSTERTON, 2004).

### **1.2.2 Definição**

As células microbianas são capazes de aderir a quase toda superfície de contato imersas em um fluido corporal ou um fluxo contínuo. Estas células aderidas crescem, reproduzem-se e produzem substâncias poliméricas extracelulares, que se estendem para além da superfície das células, formando um emaranhado polimérico que envolve toda a biomassa aderida, assumindo o conjunto a designação de biofilme (CHARACKLIS; COOKSEY; ALLEN, 1983; CHARACKLIS; WILDERER, 1989; HALL-STOODLEY; STOODLEY, 2009).

Biofilmes são definidos como, agregados de microrganismos embutidos em uma matriz polimérica e aderidos a uma superfície sólida, formando uma estrutura porosa e altamente hidratada contendo polissacarídeo extracelular, proteínas, glicoproteínas e glicolípidos (LAWRENCE et al., 1991; RICKARD et al., 2003; FLEMMING; NEU; WOZNIAK, 2007).

### **1.2.3 Estrutura e forma do biofilme**

Os métodos para análise e caracterização do biofilme evoluíram muito dos primeiros trabalhos de investigação sobre biofilmes. A microscopia confocal a laser produziu uma série de revelações que são a base dos conceitos atuais de biofilme. Dentre as observações, mostraram que os biofilmes não são estruturas homogêneas de monocamadas de microrganismos (DONLAN; COSTERTON, 2002) conforme mostra a Figura 3.

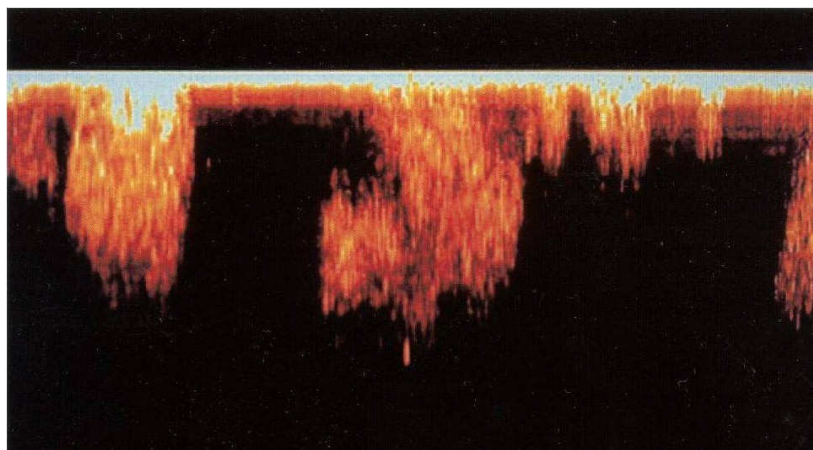


Figura 3 – Microscopia confocal a laser de um corte sagital de um biofilme no ambiente, mostrando os grupos celulares e canais de água (DONLAN; COSTERTON, 2002; STOODLEY et al., 2002)

Se as bactérias crescessem em uma camada uniforme e espessa, ficaria “abarroado” de microrganismos e, não haveria nutrientes disponíveis a grandes profundidades e resíduos tóxicos poderiam se acumular. As bactérias agrupadas em biofilme evitam esse problema ao formar estruturas tipo pilares (formato de “cogumelo”), com canais entre elas por onde a água pode transportar os nutrientes que chegam e os resíduos que saem. Um biofilme geralmente é composto por uma camada de superfície de cerca de 10  $\mu\text{m}$  de espessura, com pilares que se estendem em até 200  $\mu\text{m}$  acima. Dentro de uma comunidade de biofilme, as bactérias são capazes de compartilhar os nutrientes e, estão protegidas dos antibióticos e do sistema de defesa do hospedeiro (COSTERTON, 2004).

A técnica qualitativa de microscopia eletrônica de varredura (MEV) (Figura 4) mostrou, que as células em biofilme, apresentam uma estrutura totalmente hidratada, composta por células bacterianas envolvidas na matriz extracelular (DONLAN; COSTERTON, 2002).

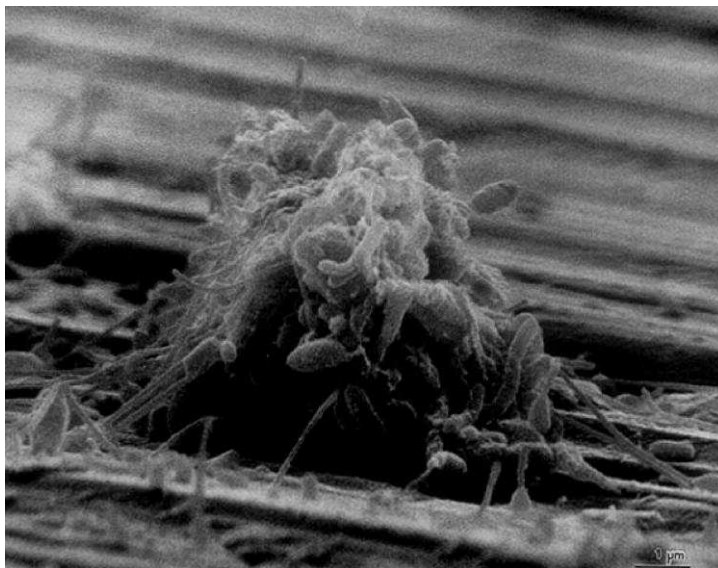


Figura 4 - Micrografia eletrônica de varredura de um biofilme misto, sobre uma superfície metálica de um reator de laboratório. A barra nas imagens corresponde a 1  $\mu\text{m}$  (DONLAN; COSTERTON, 2002)

A estrutura básica de um biofilme é constituída de células microbianas que pode ser formado de uma ou mais espécies. O biofilme é composto de 10-25% por microrganismos e 75-90% por polissacarídeo extracelular (COSTERTON; STEWART; GREENBERG, 1999).

A matriz extracelular dos biofilmes de estafilococos é composta por proteínas, polissacarídeos e DNA extracelular (DNAe) (BOLES; HORSWILL, 2008; WANG et al., 2011). A matriz fornece proteção aos ataques das células do sistema imunológico do hospedeiro e a exposição a agentes antimicrobianos. A composição exata da matriz do biofilme é muito variável, dependendo da cepa de estafilococos, o seu estado fisiológico e, a disponibilidade de nutrientes (BOLES; HORSWILL, 2011).

Em contraste com muitos outros biofilmes médicos, tais como formação de placa dentária formada por multi-espécies (biofilme misto), as infecções associadas a formação de biofilme por estafilococos não são normalmente misturadas com outras espécies (ARCIOLA et al., 2005). Uma possível explicação para este fenômeno é a comunicação inter-espécies por

sinais de *quorum-sensing*, que leva à inibição da expressão de virulência por outras espécies (OTTO, 2008).

Os biofilmes possuem uma enorme diversidade de espécies microbianas, no entanto, devido à sua maior versatilidade e resistência, as bactérias são os microrganismos predominantes. As bactérias devido às suas características como tamanhos reduzidos, elevadas taxas de reprodução, grande capacidade de adaptação e produção de substâncias extracelulares que as protegem do meio circundante, são de entre todos os microrganismos, consideradas como excelentes produtoras de biofilme (CHARACKLIS; MARSHALL, 1990).

#### **1.2.4 Etapas de desenvolvimento do biofilme de estafilococos**

A formação e, desenvolvimento de um biofilme de estafilococos, conforme apresentado na Figura 5, foi caracterizado em quatro estágios (SAUER et al., 2002; STOODLEY et al., 2002; OTTO, 2004).

No primeiro estágio ocorre a aderência inicial das células bacterianas sobre uma superfície de contato (STOODLEY et al., 2002). Esta aderência inicial ou adesão reversível ocorre por bactérias planctônicas, ou seja, bactérias que flutuam livremente no fluido corporal (MARSHALL; STOUT; MITCHELL, 1971; STOODLEY et al., 2002).

A superfície a que aderem essas bactérias pode ser um tecido ou uma superfície artificial (MACK et al., 1994). No caso de uma superfície artificial, quando inserida no corpo humano e, exposta a fluidos corporais como, sangue, urina e saliva, componentes macromoleculares recobrem a superfície exposta imediatamente para formar um filme condicionante. O filme condicionante formado sobre a superfície facilita a aderência inicial da bactéria (GRISTINA, 1987; SCHAKENRAAD et al., 1989; CHAMBERLAIN, 1992; REID; DAVIDSON; DENSTEDT, 1994; CHOONG; WHITFIELD, 2000). Os estafilococos



expressam componentes microbianos de superfície que têm a capacidade de reconhecerem e ligarem-se as moléculas adesivas no filme condicionante ( PATTI et al., 1994; HEILMANN et al., 2003).

No segundo estágio da formação do biofilme é a chamada fase de acumulação, facilitada por um fator que medeia adesão de célula a célula. Este passo inclui a divisão celular para formar as múltiplas camadas de um espesso biofilme. Ocorre também a produção do polissacarídeo extracelular resultando na aderência irreversível das bactérias a superfície de contato. O polissacarídeo extracelular atua como uma “cola” para agrupar as células bacterianas entre si e favorecer proteção as células (MACK et al., 1994; NIVENS et al., 2001; STOODLEY et al., 2002).

O terceiro estágio é caracterizado pelo desenvolvimento da arquitetura do biofilme (STOODLEY et al., 2002). Nesse estágio ocorre a maturação da arquitetura do biofilme, ou seja, o biofilme é caracterizado pelo formato de “cogumelo” (STOODLEY et al., 2002). Os microrganismos contidos dentro do biofilme permitem a entrada de proteínas, nutrientes e oxigênio (STOCK, J.; STOCK, A.; MOTTONEN, 1990; GOODMAN; MARSHALL, 1995; CHOONG; WHITFIELD, 2000).

O quarto e último estágio é caracterizado pela dispersão das células presentes no biofilme. Neste estágio ocorre o “*quorum-sensing*”, ou seja, a comunicação entre as células bacterianas para, que parte das células contidas no biofilme sejam dispersas, ou seja, tornem-se células planctônicas e, estas células livres novamente irão encontrar uma nova superfície de aderência e formar um novo biofilme (STOODLEY et al., 2002).

O *quorum-sensing* é uma estratégia de comunicação célula-célula em benefício da comunidade do biofilme, controlando o número excessivo de bactérias e a competição por nutrientes (DAVEY; O'TOOLE, 2000; DOUGLAS, 2003). As células em biofilme têm uma capacidade reduzida para fugir de tensões, como o esgotamento de nutrientes e acúmulo de

resíduos, porque estão fisicamente confinadas pela matriz. Desta forma, possuem o mecanismo de *quorum-sensing* onde, parte das células contidas no biofilme assumem a vida para planctônicas que se estendem para um habitat mais adequado. Condições ambientais desencadeiam mecanismos ativos que provocam a separação bacteriana (BOLES; HORSWILL, 2008).

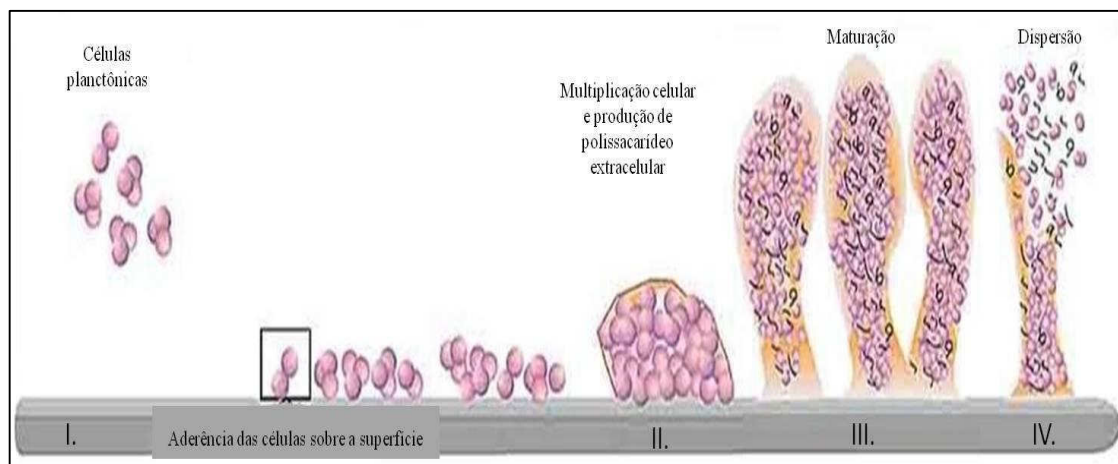


Figura 5 - Etapas da formação de um biofilme de estafilococos (<http://www.bioscience.org/2004/v9/af/1295/fig1.jpg>)

### 1.2.5 Fatores envolvidos na formação do biofilme de estafilococos

A velocidade e afinidade com que a bactéria se liga a uma superfície artificial são influenciados pelas características físicas do substrato e as superfícies celulares das bactérias. A aderência primária é muitas vezes uma interação inespecífica. É possível que haja diferentes estratégias para a adesão inicial em diferentes linhagens (COSTERTON, 2004).

### 1.2.5.1 Adesina polissacarídica capsular (PSA)

A adesina polissacarídica capsular (PSA) foi isolada a partir de células em biofilme por cepas de *S. epidermidis* (RP62A e M187) e, mostrou mediar a ligação das bactérias as superfícies do cateter urinário (MULLER et al., 1993; SHIRO et al., 1994). Mais tarde, o polissacarídeo foi isolado de cepas de *S. aureus* MN8m (MCKENNEY et al., 1998; MCKENNEY et al., 1999).

A aderência inicial das bactérias a uma superfície de contato e, a aderência de célula a célula é mediada pela adesina polissacarídica capsular (MCKENNEY et al., 1998).

A adesina polissacarídica capsular tem um papel essencial na formação e agregação do biofilme (OLSON et al., 2006).

### 1.2.5.2 Adesina polissacarídica intercelular (PIA)

A adesina polissacarídica intercelular (PIA), o qual é também chamado de poli-N-acetilglucosamina (PNAG) de acordo com a sua composição química, facilita a aderência dos estafilococos sobre uma superfície de contato para a formação do biofilme (MACK et al., 1996a; MACK et al., 1996b; COSTERTON, 2004). PIA é responsável pela adesão das células durante a fase de acumulação da formação de biofilme (MACK et al., 1994; MACK et al., 1996a; SADOVSKAYA et al., 2005).

A síntese da PIA, são codificadas pelo produto do gene *ica* do operon *icaABCD* em *S. epidermidis* e *S. aureus* (GERKE et al., 1998; CRAMTON et al., 1999; VUONG et al., 2004). A síntese desta molécula depende da glicose do meio (MACK; SIEMSEN; LAUFS, 1992).

PIA em conjunto com outros polímeros e proteínas formam a maior parte da matriz extracelular do biofilme de estafilococos (DARBY et al., 2002; KAPLAN et al., 2004; WANG; PRESTON; ROMEO, 2004).

### **1.2.5.3 Proteínas de superfície estafilocócica**

As proteínas constituem o segundo principal componente da matriz do biofilme (BOLES; HORSWILL, 2008; BEENKEN et al., 2010).

Algumas proteínas de superfície, tais como a fibronectina, proteína A, SasG foram definidas como sendo importante nas interações de célula-célula e célula-superfície (CORRIGAN et al., 2007; O'NEILL et al., 2008; CONRADY et al., 2008; MERINO et al., 2009; MARTI et al., 2010).

A matriz extracelular dos biofilmes também abrigam proteínas, por exemplo, a proteína Bap, encontra-se fixa a parede celular de *S. aureus* e servem para manter as células unidas dentro da biofilme, provavelmente, interagindo com outras proteínas na superfície das células vizinhas (LASA; PENADÉS, 2006; LATASA et al., 2006).

Uma proteína que foi recentemente descrita como tendo um papel estrutural na matriz do biofilme de *S. aureus* é a toxina beta (HUSEBY et al., 2010). A toxina beta é capaz de ligar-se ao DNA extracelular (DNAe). Proporcionando a primeira ligação entre DNAe e proteínas na estrutura dos biofilmes de estafilococos. No entanto, muitas cepas clínicas de *S. aureus* não produzem a proteína beta toxina (VAN WAMEL et al., 2006).

Timmerman et al. (1991) e Veenstra et al. (1996), identificaram uma proteína na superfície da célula de *S. epidermidis*, chamadas de proteínas de superfície estafilocócica SSP-1 (280 kDa) e SSP-2 (250 kDa). Essas duas proteínas de superfície possuem afinidade

pelo polímero e contribuem para a aderência dos estafilococos ao substrato (PETERS; LOCCI; PULVERER, 1982).

#### **1.2.5.4 Adesão intercelular pelo gene**

Donlan e Costerton (2002) mostraram que cerca de 45 genes diferem na expressão entre as células sésseis e as células planctônicas.

A adesão intercelular (*ica*) foi inicialmente identificada em uma cepa de biofilme de *S. epidermidis* RP62A, devido à sua capacidade de formar um biofilme sobre uma superfície de poliestireno (HEILMANN et al., 1996). Esta cepa continha a parte funcional do locus *ica*, genes *icaA*, *icaB*, *icaC* e *icaD*, que constituem uma única unidade transcricional (MACK et al., 1994, 1999, 2000; HEILMANN 1996, 1998; ZIEBUHR et al., 1999).

Conforme descrito por vários autores, os produtos do locus *ica* foram demonstrados fundamentais para a formação do biofilme e virulência dos microrganismos (O'TOOLE; KAPLAN; KOLTER, 2000; STANLEY; LAZAZZERA, 2004). No entanto, deleções do locus *ica* não alteram o fenótipo do biofilme (BOLES; HORSWILL, 2011).

O produto do gene *icaABCD* mostraram-se importantes na formação dos biofilmes de *S. aureus* e *S. epidermidis* (CRAMTON et al., 1999; HEILMANN et al., 1996; MACK, 1999; MCKENNEY, 1998, 1999). Arciola, Baldassari e Montanaro (2001) corrobora com a afirmação, demonstraram que os genes *icaA* e *icaD* tem importante papel na formação dos biofilmes de *S. epidermidis* e *S. aureus*.

### 1.3 Resistência estafilocócica aos agentes antimicrobianos

O bacteriologista Alexander Fleming descobriu o primeiro antibiótico, a penicilina em 1929 e, mais tarde, observou a resistência natural dos microrganismos, descrevendo que bactérias do grupo coli-tifóide e a *Pseudomonas aeruginosa* não eram inibidas pela ação da penicilina (FLEMING, 1980). Abraham e Chain (1940), mostraram que cepas de *Escherichia coli* produziam uma enzima capaz de destruir a ação da penicilina, a qual denominaram de penicilinase.

O isolamento de estafilococos resistentes às penicilinas, foi observado logo após os primeiros experimentos em 1941, registrando-se em 1944-1945 índices de resistência de 12 a 22% (MOREIRA; DAUM, 1995). Bauer, Perry e Kirby, verificaram que em algumas cepas de *S. aureus* isolados de material clínico mostravam-se resistentes à penicilina devido à produção de penicilinase (BAUER; PERRY; KIRBY, 1960).

Em 1950 a resistência já atingia em torno de 30% das amostras hospitalares. Ao final da década de 1950, cerca de 80% dos estafilococos isolados em hospitais mostravam-se resistentes às penicilinas devido à produção de penicilinases inativadoras destas drogas (BAUER, PERRY, KIRBY, 1960; LACEY, 1973).

Para combater estes estafilococos foram descobertas as penicilinas antiestafilocócicas, tais como a meticilina, oxacilina e as cefalosporinas da primeira e segunda geração. Contudo, logo após a introdução das primeiras penicilinas antiestafilocócicas, surgiram bactérias resistentes a elas, inicialmente na Europa, em 1961 (HALEY et al., 1982; MAPLE; BRUMFITT, 1989; MOREIRA; DAUM, 1995), chamados de *S. aureus* meticilina ou oxacilina resistentes (MRSA).

Em inúmeros, microrganismos o fenômeno da resistência é natural. Em particular, a resistência é necessariamente específica contra um determinado antibiótico naqueles microrganismos produtores desta mesma substância (DEMAIN, 1974; CUNDLIFFE, 1984).

A importância do problema coincide com a introdução e a ampla utilização de inúmeros antimicrobianos na década de 1950, expandindo-se a partir de 1960, com a introdução dos novos antibióticos beta-lactâmicos, e agravando-se nas décadas de 1980 e 1990, com o surgimento de novas formas de resistência e a disseminação de microrganismos resistentes (SUASSUNA, I.; SUASSUNA, I.R., 1971; LINTON, 1984; SAUNDERS, 1984; BUU-HOI; GOLDSTEIN; ACAR, 1986; FEINMAN, 1998; WITTE, 1998).

Assim como os estafilococos (MRSA) mostraram-se resistentes aos antibióticos beta-lactâmicos, da mesma maneira, cepas de *S. epidermidis*, *S. saprophyticus* e *S. haemolyticus*, passaram a demonstrar resistência à oxacilina e substâncias afins. Frequentemente, os estafilococos resistentes aos beta-lactâmicos mostram-se também resistentes a macrolídeos, aminoglicosídeos, tetraciclina e mupirocina por mecanismos bioquímicos específicos. É também observado a resistência dos estafilococos às fluoroquinolonas (LACEY, 1973; CROSSLEY et al., 1979; MALOUIN; BRYAN, 1986; COUGHTER; JOHNSTON; ARCHER, 1987; MAPLE; BRUMFITT, 1989; BOYCE, 1992; MULLIGAN et al., 1993; MULAZIMOGLU; DRENNING; YU, 1996; KAATZ; SEO, 1997; BRYSKIER, 1998).

*S. aureus* e *S. epidermidis*, mostraram-se resistentes à penicilina, ampicilina e amoxicilina em mais de 70% das cepas isoladas, não sendo mais indicado o uso destes antimicrobianos para o tratamento de infecções estafilocócicas, mesmo que benignas e mesmo que procedam do ambiente extra-hospitalar (DUARTE; VERAS; MARTINS, 1994; SANTOS FILHO; FREITAS; SIQUEIRA, 1994; RANGEL et al., 1995; PINTO et al., 1996; SADER, 1998).

Os estafilococos coagulase-negativo (SCoN), embora considerados inócuos da pele ou contaminantes de cultura, são conhecidos como importantes patógenos. *S. epidermidis* esta entre 50 a 70% dos isolados de infecções em cateter (WISPLINGHOFF et al., 2004; CERVERA et al., 2009). O tratamento dessas infecções é complicado pela resistência das células aos antibióticos (GARRETT et al., 1999; JOHN; HARVIN, 2007).

Isolados clínicos de SCoN de infecções relacionadas a protese valvular cardíaca, 82% foram *S. epidermidis* e, destes 67% eram resistentes a meticilina, denominados de *S. epidermidis* meticilina resistentes (MRSE) (CHU et al., 2009).

O tratamento de antimicrobianos para MRSE tem por base a administração de um agente glicopeptídeo, como a vancomicina (BADDOUR et al., 2005). No entanto, esta opção terapêutica é limitada devido a cepas de *S. epidermidis* resistentes a vancomicina ou há outros glicopeptídeos, denominados de GISE (*S. epidermidis* com resistência a vancomicina ou aos glicopeptídeos) (GARRETT et al., 1999; BIAVASCO; VIGNAROLI; BADDOUR et al., 2005; JOHN; HARVIN, 2007; HOPE et al., 2008). A resistência aos glicopeptídeos foi inicialmente observada em estafilococos que também mostravam resistência à meticilina e oxacilina (WALDVOGEL, 1999). Cerca de 70 a 80% dos isolados clínicos (SCoN) de amostra clínica apresentaram susceptibilidade reduzida a vancomicina (JOHN; HARVIN, 2007).

A vancomicina é o tratamento recomendado para infecções causadas por *S. epidermidis* resistentes a meticilina (MRSE), no entanto com o surgimento de cepas com sensibilidade reduzida à vancomicina, faz com que seja necessária a utilização de outras terapias alternativas. Entre elas, a daptomicina, um lipopeptídeo cíclico com atividade bactericida contra bactérias gram-positivas representando uma opção terapêutica clínica (MERMEL et al., 2010; AHLSTRAND et al. 2011).



Cepas de *S. aureus* também mostraram reduzida sensibilidade à vancomicina. Estes estafilococos chamados inicialmente de VISA e GISA (*Staphylococcus aureus* (SA) com resistência à vancomicina ou aos glicopeptídeos, são atualmente denominados simplesmente de VRSA (Vancomicina Resistente SA) (HIRAMATSU et al., 1997b).

A seleção natural de cepas resistentes criou uma competição entre a tecnologia e a evolução das bactérias. Com o uso desregrado dos agentes antimicrobianos, há várias décadas, a resistência aumentou nos estafilococos, levando a novos desafios tanto para o tratamento individual como para os programas de controle (NEU, 1992).

O uso clínico dos antimicrobianos exerce papel selecionador das cepas resistentes e, provavelmente, é a principal causa da resistência, sobretudo a observada no ambiente hospitalar, onde o uso de agentes antimicrobianos é maior (SWARTZ, 1997; CORREA; DAVID; GONTIJO, 1989).

A resistência antibiótica foi associada com a formação de biofilme que, uma vez que se estabelecem são difíceis de erradicar (MOSTELLER; BISHOP, 1993; CLOETE; JACOBS; BROZEL, 1998; BORCHARDT et al., 2001; PARKAR et al., 2001; CORDIER; UCKAY et al., 2009). A natureza da estrutura do biofilme e os atributos fisiológicos dos microrganismos dentro do biofilme conferem uma resistência inerente aos agentes antimicrobianos (DONLAN; COSTERTON, 2002; WELLS et al., 2011).

Os tratamentos convencionais com uso de agentes antimicrobianos são incapazes de erradicar as infecções ocasionadas por formação de biofilme sobre os dispositivos implantáveis, levando muitas vezes a remoção desse dispositivo. Infecções crônicas podem servir como foco séptico que pode levar a osteomielite, sepse aguda e até a morte, especialmente em pacientes imunocomprometidos (BAIRD-PARKER, 1965; CRAMTON; GOTZ, 2004; STUBBINGS; LABISCHINSKI, 2009).

Sabe-se que bactérias em biofilme são frequentemente mais resistentes aos agentes antibióticos e, há uma crescente incidência de cepas de estafilococos resistentes à meticilina, vancomicina, dentre outros antibióticos, dificultando o tratamento. As bactérias em biofilme também são resistentes ao sistema imune do hospedeiro, mesmo em um indivíduo saudável. Acredita-se que a resistência das bactérias em biofilme seja devido a matriz de polissacarídeo extracelular que envolve as bactérias, impedindo a difusão dos antibióticos para as células-alvo ( MACK, 1999; GOTZ; PETERS, 2000; DONLAN, 2001; O'GARA; HUMPHREYS, 2001; VON EIFF; PETERS; HEILMANN, 2002; COSTERTON, 2004; PRESTERL et al., 2009).

Os agentes antimicrobianos devem-se difundir através da matriz do biofilme, a fim de inativar as células. As substâncias poliméricas extracelulares que constituem esta matriz apresentam uma barreira de difusão para estes agentes, influenciando a taxa de transporte do antibiótico para o interior do biofilme (DONLAN; COSTERTON, 2002).

As bactérias em biofilmes são menos suscetíveis a ação de antimicrobianos comparadas as células planctônicas (KIRBY; GARNER; LEVIN, 2012). Nos estudos de Hoyle, Wong e Costerton (1992), mostraram que as células bacterianas planctônicas foram 15 vezes mais sensíveis à tobramicina (aminoglicosídeo) comparadas com as células em biofilme. Outros estudos demonstraram que as bactérias nos biofilmes tornaram-se de 10-1000 vezes mais resistentes aos efeitos dos agentes antimicrobianos quando comparadas com as células livres das mesmas cepas (AMORENA et al., 1999; OLSON et al., 2002; CONLEY et al., 2003; CERCA et al., 2005; FUX et al., 2005). Nos estudos de Costerton et al. (2004) mostraram que as células em biofilme de *S. aureus* e *S. epidermidis* são mais resistentes a ação dos antibióticos quando comparadas com as células planctônicas das mesmas cepas, tornando difícil erradicar a infecção.

Muitos estudos *in vitro* atribuíram esta susceptibilidade reduzida das células sésseis ao modo de crescimento do biofilme ( PROSSER et al., 1987; EVANS, 1987, 1991; CERI et al., 2001; KIRBY; GARNER; LEVIN, 2012). As bactérias em biofilme não crescem exponencialmente, elas existem em crescimento lento ou estacionário. Deste modo, o lento crescimento das bactérias sésseis também lhes proporciona proteção aos agentes antimicrobianos (DONLAN, 2001; VON EIFF; PETERS; HEIMANN, 2002; HAJDU et al., 2009; PRESTERL et al., 2009).

A medida primária e muitas vezes única da farmacodinâmica de antibióticos e bactérias-alvo é o CIM (ANDES et al., 2004; GILLESPIE; KUTI; NICOLAU, 2005; BAUDOUX et al., 2007). A determinação da concentração inibitória mínima (CIM) realizadas com as células planctônicas (GANDER, 1996), mostraram nos estudos de Tetz, Artemenko e Tetz (2009) que o uso de antibióticos na concentração CIM não causam nenhum efeito de morte sobre as células bacterianas em biofilme.

Lewis (2001) diz em seus estudos que a resistência antibiótica é definida pela capacidade das bactérias crescerem em concentrações de antibióticos acima do CIM, como observado na maior parte das células em biofilme.

O tratamento das infecções causadas por estafilococos tem-se tornado cada vez mais difícil, devido ao aumento da resistência aos antibióticos. Um percentual elevado das amostras circulantes em hospitais apresenta resistência a maioria dos antibióticos recomendados para uso em casos de infecções estafilocócicas. A formação de biofilme por estas bactérias dificultam a ação dos antibióticos e prejudica as células leucocitárias da resposta imune do hospedeiro (COSTERTON, 2004; DOMÍNGUEZ-HERRERA et al., 2012). Desta forma, faz com seja necessário a utilização de outras terapias alternativas com agentes antimicrobianos.

## 1.4 Agentes farmacológicos

### 1.4.1 N- acetilcisteína (NAC)

N-acetilcisteína (NAC) é um agente mucolítico, mas pode também atuar como um antimicrobiano, com ação anti-inflamatória (SIAFAKAS et al., 1995; LEUENBERGER et al., 1997). NAC é comumente usado no tratamento médico de bronquite crônica (REHM; VALLA, 1997; STEY et al., 2000). O NAC é amplamente utilizado na prática clínica por meio de inalação, via oral e intravenoso e, tem excelente perfil de segurança (KAO et al., 2003).

NAC é uma das menores moléculas de medicamento em uso, com um total de 19 átomos, que apresenta propriedades antibacterianas (NOSZAL; VISKY; KRASZNI, 2000). A molécula é um tiol contendo antioxidantes que perturba pontes dissulfeto no muco (SHEFFNER, 1963; BLANCO et al., 1997).

N- acetilcisteína afeta vários processos que são importantes para a formação do biofilme bacteriano, com redução drástica de polissacarídeo extracelular e, portanto age como uma substância anti-biofilme (OLOFSSON; HERMANSSON; ELWING, 2003). O polissacarídeo extracelular é um dos principais componentes em biofilmes e, nos estudos de Olofsson, Hermasson e Elwing (2005) mostraram a redução do polissacarídeo extracelular com o uso de NAC, alterando a textura de formação do biofilme. Outros autores afirmam que NAC penetra na membrana celular bacteriana (MAZOR et al., 1996).

NAC diminuiu a formação de biofilme por uma variedade de bactérias (PEREZ-GIRALDO et al., 1997; MARCHESE et al., 2003; SCHWANDT et al., 2004) e reduziu a produção de polissacarídeo extracelular da matriz dos biofilmes (OLOFSSON;

HERMANSSON; ELWING, 2003) promovendo o rompimento do biofilme maduro (MARCHESE et al., 2003; SCHWANDT et al., 2004).

Os estudos de Aslam et al. (2007), mostraram a combinação do uso de NAC com tigeciclina sobre biofilme bacteriano de diversos isolados clínicos. A combinação NAC-tigeciclina diminuiu significativamente as células em biofilme de *S. aureus* resistente a meticilina (MRSA) e *S. epidermidis*.

Como descrito anteriormente por outros autores (COSTERTON, 2004; TETZ, G.; ARTEMENKO; TETZ, V., 2009), é necessário utilizar altas doses de antibióticos para erradicar as células em biofilme, no entanto, mesmo o uso de altas doses de antibióticos tem mostrado um sucesso limitado na prática clínica (KRISHNASAMI et al., 2002; RIJNDERS et al., 2005). Isto pode ser devido a penetração inadequada dos antibióticos e a presença do polissacarídeo extracelular que prejudicam a ação dos antibióticos (DAROUICHE et al., 1994; WEINSTEIN; DAROUICHE, 2001; TRAUTNER; DAROUICHE, 2004). Com o uso combinado de agentes antimicrobianos, como por exemplo, a combinação NAC-tigeciclina, por meio da ação do NAC é possível que as bactérias fiquem mais suscetíveis a ação do antibiótico, devido a degradação do polissacarídeo extracelular nos biofilmes (ASLAM et al., 2007).

### 1.4.2 Rifampicina

As rifampicinas pertencem a um grupo de agentes antibacterianos, pertencentes a família dos antibióticos ansamicinas, do grupo dos macrolídeos, isoladas pela primeira vez em 1959 em Milão, Itália (FLOSS; YU, 2005). A rifampicina é um antibiótico semi-sintético, produzidas por linhagens de *Nocardia* (*Streptomyces mediterranei*/ ATCC 13685). A rifampicina inibe a atividade da enzima DNA polimerase, isso suprime a síntese de RNA bacteriano (BACCHI et al., 1998; ZHANG, 2004).

A rifampicina é um antibiótico eficaz contra bactérias gram-positivas, incluindo micobactérias, sendo frequentemente utilizado para tratamento de tuberculose juntamente com outros antibióticos em combinação (DAVIES; YEW, 2003; MITCHISON, 2005).

A rifampicina não pode ser usada como único agente para tratar infecções, por causa da rápida seleção de mutantes resistentes (ABOSHKIWA; ROWLAND; COLEMAN, 1995; AUBRY-DAMON; SOUSSY; COURVALIN, 1998). A resistência pode ocorrer mesmo quando altas concentrações de rifampicina são utilizados (GARRISON et al., 1997).

No entanto, a combinação de rifampicina com outros agentes anti-estafilocócicos podem impedir o aparecimento de resistência a rifampicina durante o tratamento (MOELLERING, 2008). A terapia combinada parece ser benéfica, as bactérias tem mostrado susceptibilidade ao uso de agentes antimicrobianos combinados (PERLROTH et al., 2008).

### 1.4.3 Linezolida

Com o aumento da resistência dos estafilococos aos agentes antibióticos criaram a necessidade para o desenvolvimento de novos agentes (JONES, 2003). O linezolida e a daptomicina são novos agentes antibióticos desenvolvidos, ativos contra cocos gram-positivos (MOELLERING, 1991; RYBAK et al., 2000).

O linezolida, pertencente a classe das oxazolidinona, tem excelente atividade contra a maioria dos estafilococos gram-positivos incluindo cepas resistentes a meticilina e enterococos multi-resistentes (BOSTIC et al., 1998; RYBAK et al., 2000) embora a resistência começou a emergir (JOHNSON et al., 2002; PAI et al., 2002; PILLAI et al., 2002). O linezolida é a primeira nova classe de agentes antimicrobianos completamente sintético, e possui mecanismo de ação na síntese proteica bacteriana (JEVITT et al., 2003). O linezolida foi introduzido no mercado farmacêutico entre 2000-2001 (DIAZ; RUIZ; ROYO, 2003).

Conforme a ação bacteriostática conhecida do linezolida, vários estudos confirmaram sua ação no tratamento de infecções por cepas de *S. aureus* (HOWE et al., 1999; HOWDEN et al., 2004; HUANG et al., 2008).

Cepas de *S. aureus* e *S. epidermidis*, que apresentam susceptibilidade reduzida a vancomicina manteve susceptibilidade ao tratamento com linezolida (JEVITT et al., 2003).

O linezolida tem excelente biodisponibilidade oral e penetração nos tecidos, portanto é uma promessa para erradicação de bactérias que residem no tecido peri-implante (MERMEL et al., 2001; STEIN et al., 2005). Nos estudos de Broekhuizen et al. (2008), mostraram que a infecção por *S. epidermidis* no tecido peri-implante não foram erradicados pelos antibióticos utilizados, vancomicina e rifampicina, deste modo, *S. epidermidis* persistiu mesmo após tratamento antimicrobiano.

#### 1.4.4 Daptomicina

A daptomicina apresenta um espectro de atividade muito semelhante a vancomicina e, é altamente ativa contra bactérias aeróbias e anaeróbias gram-positivas resistentes, incluindo meticilina resistentes de estafilococos e enterococos. Ela é útil no tratamento de infecções por bactérias multirresistentes (RYBAK et al., 2000; SNYDMAN et al., 2000; BARRY; FUCHS; BROWN, 2001; SILVERMAN et al., 2001; WISE; ANDREWS; ASHBY, 2001; HUANG et al., 2007; PRESTERL et al., 2009).

A daptomicina é um antibiótico com potente atividade contra estafilococos (CHA, BROWN; RYBAK, 2003; SAFDAR; ANDES; CRAIG, 2004).

Daptomicina é um lipopeptídeo cíclico natural produzido por *Streptomyces rosesporus*. Sua ação é na membrana citoplasmática de bactérias sensíveis, rompendo a integridade funcional da membrana citoplasmática e, desencadeando a liberação de íons intracelulares resultando em rápida morte celular bacteriana. A atividade de daptomicina é dependente dos níveis fisiológicos de íons de cálcio livre (SILVERMAN; PERLMUTTER; SHAPIRO, 2003).

A daptomicina exibiu meia-vida longa (8-9 h) e alta ligação as proteínas (92%), o que permite sua administração uma vez ao dia. Além disso, parece ser bem tolerada, com leves efeitos colaterais, no entanto estes efeitos são completamente revertidos após a descontinuação do antibiótico (DANDEKAR et al., 2003; DVORCHIK et al., 2003).



### 1.4.5 Vancomicina

A vancomicina foi descoberta pela empresa Eli Lilly em 1950, onde posteriormente isolaram o microrganismo *Amycolopsis orientalis* (*Streptomyces orientalis* e *Nocardia orientalis*) e, observaram a produção de uma substância que inibia gram-positivos (LEVINE, 2006). O antibiótico vancomicina é um glicopeptídeo e foi lançado em 1958 no mercado farmacêutico (HIRAMATSU, et al., 1997a, 1997b).

Vancomicina é um inibidor da síntese da parede celular em *S. aureus* e, outras bactérias gram-positivas (POOTOOLAL; NEU; WRIGHT, 2002).

A vancomicina difunde lentamente nas camadas mais profundas do biofilme bacteriano, arriscando uma resistência devido à exposição gradual das células bacterianas a baixas concentrações (JEFFERSON; GOLDMANN; PIER, 2005).

Após o surgimento da resistência a meticilina em *S. aureus* (MRSA) na década de 1960, os glicopeptídeos, principalmente a vancomicina tornou-se o antibiótico de escolha para tratar infecções graves por MRSA (LEVINE, 2006). As células de *S. aureus* e outras bactérias gram-positivas em biofilmes, são muitas vezes tratadas com vancomicina e, em alguns casos em combinação com rifampicina (ISIKLAR et al., 1999). O desenvolvimento de resistência é reduzido quando estes antibióticos são combinados (LUCET et al., 1990; CHUARD et al., 1991; GAGNON; RICHARDS; SUBANG, 1992; BLASER et al., 1995).

A vancomicina com ou sem a rifampicina é uma das terapias recomendadas para tratar infecções associadas ao dispositivo artificial implantado, que são predominantemente causadas por *S. epidermidis* (MERMEL et al., 2001; PHILIPPE; YOK-AI, 2004; ZIMMERLI; TRAMPUZ; OCHSNER, 2004). Outros estudos sugerem que um tratamento ideal para infecção associadas ao dispositivo artificial deve incluir antibióticos que atuem intracelularmente (BROEKHUIZEN et al., 2008). Combinações de antibióticos como

linezolida com vancomicina mostraram reduzir significativamente as células de estafilococos presentes nas infecções do tecido subcutâneo (GIACOMETTI et al., 2003).

A vancomicina é conhecida por penetrar em biofilmes e efetivamente reduzir o número de bactérias (DUNNE; MASON; KAPLAN, 1993; WILCOX et al., 2001). Apesar disso, o tratamento com vancomicina ainda pode ter uma taxa relativamente elevada de fracasso (BURNS, 2006). Isso pode ser explicado pela baixa atividade metabólica das bactérias em biofilme (YAO; STURDEVANT; OTTO, 2005).

## 1.5 Objetivo

### 1.5.1 Geral

Os estafilococos apresentam capacidade de formar biofilme em superfícies bióticas e abióticas. As bactérias em biofilme, são envolvidas e protegidas pela produção de polissacarídeo extracelular, o que as torna extremamente resistentes, dificultando a ação de terapias antibióticas usadas atualmente e tornam-se um grave problema de saúde pública.

As infecções ocasionadas pela formação de biofilme de estafilococos tem apresentado resistência aos tratamentos antibióticos disponíveis, deste modo, o objetivo geral desta tese consistiu em determinar a eficácia de agentes farmacológicos sozinhos e combinados, afim de, obter novas estratégias terapêuticas para o tratamento e controle das infecções ocasionadas por biofilmes de *Staphylococcus epidermidis* e *S. aureus*.

### 1.4.2 Específico

Mais especificamente, avaliar a tolerância/ resistência dos biofilmes de *S. epidermidis* e *S. aureus* formados por diversos isolados clínicos aos agentes farmacológicos.

1. Avaliar os agentes antimicrobianos sozinhos e em combinação com N-acetilcisteína (NAC), que é amplamente utilizado na prática clínica e de acordo com outros pesquisadores reduz de maneira significativa o polissacarídeo extracelular das células em biofilme. Deste modo, sugerimos que um agente mucolítico e antibacteriano como o NAC possa ser um adjuvante potencial na ação dos antibióticos contra as células em biofilme e, uma vez que o desenvolvimento da resistência é reduzido quando o uso dos agentes antimicrobianos são combinados.

2. Avaliar os agentes farmacológicos nas concentrações CIM e concentrações superiores a CIM, levando em consideração que o uso de antibióticos na concentração CIM não causam efeito de morte sobre as células bacterianas em biofilme.

3. Avaliar os agentes farmacológicos sozinhos e combinados contra as células em biofilme e contra as células planctônicas, para possibilitar uma avaliação da resistência das células em biofilme pelos agentes avaliados.

# **Capítulo II**

## **Desenvolvimento**

## 2. Desenvolvimento- Material e Métodos

A primeira parte do estudo foi realizada no departamento de Engenharia Biológica, laboratório de Microbiologia Aplicada da Universidade do Minho, campus de Braga/Portugal. Concentrou-se sobre o efeito do NAC, rifampicina, linezolida e daptomicina. Os agentes farmacológicos foram avaliados contra biofilmes de *S. epidermidis*. O efeito dos agentes foram avaliados por métodos qualitativos (microscopia eletrônica de varredura) e quantitativos (unidades formadoras de colônia, método colorimétrico XTT, cristal violeta), afim de, obter uma visão global sobre seus efeitos em células sésseis e planctônicas para possibilitar uma avaliação da resistência das células em biofilme pelos agentes avaliados. Foram realizados métodos quantitativos para extração da matriz do biofilme, para obtermos informações sobre a quantidade de polissacarídeo que compõem o biofilme.

A segunda parte desta tese foi realizada no laboratório de Microbiologia Clínica do Núcleo de Atendimento a Comunidade (NAC) do Centro de Referência Diagnóstica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas/ UNESP, campus de Araraquara. Concentrou-se sobre o efeito do NAC e da vancomicina avaliados sozinhos e em combinação contra as células em biofilmes de *S. epidermidis* e *S. aureus*. O efeitos dos dois agentes foram avaliados por métodos quantitativos (unidades formadoras de colônia).

A análise da detecção do gene *icaD*, importante para a formação de biofilme, foi avaliado em todas as cepas utilizadas nesta tese de *S. epidermidis* e *S. aureus*. Esta análise foi realizada no laboratório de Epidemiologia Molecular, departamento de Medicina Veterinária Preventiva- Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias “Júlio de Mesquita Filho”/ UNESP, campus de Jaboticabal.

## 2.1 Isolados clínicos de *Staphylococcus epidermidis* e *S. aureus*

Tabela 1 - Identificação laboratorial dos estafilococos

	<i>S. epidermidis</i>	<i>S. aureus</i>
	<b>1</b>	<b>2</b>
<b>Identificação</b>	<b>127</b>	<b>35</b>
<b>laboratorial</b>	<b>165</b>	<b>73</b>
	<b>1457</b>	<b>173</b>
	<b>9142</b>	<b>174</b>

Os isolados clínicos de *S. epidermidis* 1457 e 9142 foram fornecidas por Dr. Pier, G.B., Laboratório Channing, Departamento de Medicina, Escola Médica de Harvard, Boston/USA.

Os demais isolados clínicos de ponta de cateter, hemocultura e urina de *S. epidermidis* e *S. aureus* foram fornecidos pelo laboratório de Microbiologia Clínica do Núcleo de Atendimento a Comunidade (NAC) do Centro de Referência Diagnóstica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas/ UNESP, Araraquara.

## 2.2 Agentes farmacológicos avaliados

### Sozinhos:

- ✓ N-acetilcisteína (NAC) (Sigma)
- ✓ Rifampicina (Sigma)
- ✓ Linezolida (Sigma)
- ✓ Daptomicina (Sigma)
- ✓ Vancomicina (Sigma)

### Combinados:

- ✓ N-acetilcisteína (NAC) com rifampicina
- ✓ N-acetilcisteína (NAC) com linezolida
- ✓ N-acetilcisteína (NAC) com vancomicina

## 2.3 Cepas bacterianas- condições de armazenamento

Todos os isolados clínicos de *Staphylococcus epidermidis* e de *Staphylococcus aureus* foram preservados em criotubos (contendo TSB com glicerol) e, estocados igual ou inferior a -120°C em um freezer de nitrogênio líquido para uso posterior.

## 2.4 Preparo da suspensão bacteriana

Os meios de cultura utilizados, *Tryptic Soy Agar* (TSA) e *Tryptic Soy Broth* (TSB) foram preparados de acordo com as instruções do fabricante.



Segundo o método proposto por Gomes et al., 2009, a partir dos criotubos para cada cepa separadamente foi realizado um repique em placas de TSA com auxílio de uma alça de 10 µl. As placas de TSA foram incubadas por 24 horas a 37°C. Após o período de incubação, com auxílio de uma alça bacteriológica cerca de 3 a 4 colônias crescidas nas placas de TSA de cada cepa separadamente foram transferidas para tubos Falcon (50 ml) contendo 15-20 ml de TSB.

Os tubos foram incubados por 16-18 h (overnight) a 37°C em agitação orbital de 130 rpm. Após o período de incubação os tubos foram submetidos a centrifugação por 5 minutos a 4°C em 9500 rpm. O sobrenadante foi descartado e, a biomassa obtida foi ressuspensa em 15 ml de TSB. De cada amostra separadamente, foram transferidos 200 µl para poços de cultura de uma placa de microtitulação de 96 poços (Sarstedt, Newton, NC, USA), afim de, ajustar a densidade óptica (640 nm).

A densidade óptica obtida em 0.6 corresponde aproximadamente a  $1 \times 10^9$  UFC/ml (Unidades formadoras de colônia/ml). Após a densidade óptica ajustada realizou-se diluições em TSB a fim de obter uma suspensão equivalente a  $1 \times 10^6$  UFC/ml para uso posterior.

## **2.5 Ágar vermelho Congo**

O meio de cultura denominado ágar vermelho Congo é constituído de caldo infusão cérebro-coração 37 g/l, sacarose 50 g/l, ágar 10 g/l e o corante vermelho Congo 0,8 g/l. Segundo Bernardi; Pizzolitto, E.; Pizzolitto, C.; 2007, O corante vermelho Congo foi preparado como solução aquosa concentrada, autoclavado separadamente a 121°C por 15 minutos, sendo adicionado ao ágar quando este atingiu a temperatura de 55°C e, distribuídos em placas Petri (90x15 mm).

As suspensões preparadas de *S. epidermidis* e *S. aureus* ( $1,5 \times 10^8$  UFC/ml) foram semeadas sobre placas de Petri (contendo o meio de cultura preparado e solidificado) por esgotamento com alça bacteriológica, incubados a 35-37°C por 24 horas. Após o período de incubação, as placas permaneceram em temperatura ambiente por mais 18 horas. Os estafilococos que produziram colônias negras foram considerados *slime* positivo, enquanto que as colônias que mostraram cor vermelha foram consideradas *slime* negativo.

## **2.6 Detecção do gene *icaD***

### **2.6.1 Extração do DNA- Kit RTP® Bactéria DNA mini Kit (250) (Invitex)**

O DNA cromossomal de *S. epidermidis* e *S. aureus* foram extraídos com o Kit Invitex®.

A partir dos criotubos, para cada cepa separadamente foi realizado um repique em placas de TSA com auxílio de uma alça de 10 µl. As placas de TSA foram incubadas por 24 horas a 37°C. Após o período de incubação, com auxílio de uma alça bacteriológica cerca de 3 a 4 colônias crescidas das placas de TSA de cada cepa separadamente foram transferidas para tubos Falcon (50 ml) contendo 15-20 ml de TSB. Esses tubos foram incubados por 16-18 h (overnight) a 37°C em agitação orbital de 130 rpm.

Após o período de incubação, 1,5 ml de cada amostra separadamente foram transferidas para eppendorfs. Os eppendorfs foram centrifugados por 3 minutos a 4°C e 10.000 rpm. Após a centrifugação foram removidos totalmente os sobrenadantes de cada amostra. A cada tudo de eppendorfs contendo a biomassa foram adicionados 400 µl do Buffer R.

As biomassas ressuspendidas foram transferidas para um tubo L e submetidas ao vórtex. Os tubos foram incubados no Thermomixer (Compact) por 10 minutos a 37°C com 300 rpm

e, em seguida incubados no Thermomixer (Compact) por 10 minutos a 65°C com 300 rpm. A alta temperatura promove o rompimento da parede celular bacteriana.

Após os períodos de incubação, as amostras foram transferidas separadamente para um tubo L (contém proteína K e outras substâncias para extração) e, novamente as amostras foram incubadas no Thermomixer (Compact) por 10 minutos a 95°C com 300 rpm. Após o período de incubação foram adicionados a cada amostra 400 µl do Buffer B6 e submetidos ao vórtex.

As amostras foram transferidas para o tubo RTA Spin Filter Set (presença de coluna) e, incubados por 1 minuto a temperatura ambiente. Os tubos foram centrifugados a 12.000 rpm por 1 minuto a 4°C. Após a centrifugação os filtrados foram descartados e as colunas transferidas para outro tubo RTA Receiver tubes, adicionando a cada amostra 500 µl do Buffer I e submetidos a centrifugação (10.000 rpm- 1 minuto a 4°C).

Os filtrados foram novamente descartados e as colunas transferidas para novo tubo, adicionando a cada amostra 600 µl do Buffer II e, centrifugados a 10.000 rpm por 3 minutos a 4°C, a fim lavar o DNA que está na coluna.

Após a centrifugação as colunas foram transferidas para um tubo Receiver 1,5 ml e, adicionado a cada amostra 200 µl do Elution Buffer D (aquecido a 65°C). As amostras foram incubadas por 1 minuto em temperatura ambiente e centrifugadas a 8.000 rpm por 1 minuto a 4°C. Posteriormente as colunas foram desprezadas e os filtrados com o material genético desejado foram armazenados em freezer a -20°C até o momento da utilização nas reações de PCR.

### 2.6.2 Reação em cadeia da polimerase (PCR) - Operon *icaD*

Para a realização da PCR, preparamos uma reação com um volume final de 20  $\mu\text{L}$ , da qual consistiu em 2,5 mM  $\text{MgCl}_2$ , 200  $\mu\text{M}$  de cada nucleotídeo, 1  $\mu\text{M}$  de cada oligonucleotídeo iniciador, 1.25 U de Taq polimerase e 100 ng de DNA molde. As misturas de PCR foram submetidas a trinta ciclos de amplificação que consistiram na desnaturação a 92°C por 45 segundos, o anelamento a 49°C por 45 segundos, extensão a 72°C por 1 minuto, com uma extensão final de 72°C por 7 minutos em um termociclador (Mastercycler gradient, Eppendorf).

A presença e tamanho da amplificação dos produtos foram confirmados por eletroforese em gel de agarose 1%, corado com Gel red (Uniscience). Foi utilizado um marcador de tamanho 100 pb (Invitrogen, Brasil). Foram consideradas positivas as cepas com tamanho de banda de 200 pb para o produto do gene *icaD*.

As sequências dos oligonucleotídeos:

*icaDF*:5' ATGGTCAAGCCCAGACAGAG3'

*icaDR*:5' CGTGTTTTCAACATTTAATGCAA-3'

### 2.7 Concentração inibitória mínima (CIM)

Os critérios de interpretação para os testes de sensibilidade foram baseados nas diretrizes do CLSI. Deste modo, uma solução estoque concentrada foi preparada para cada agente farmacológico avaliado, para posterior diluição.

Segundo Amsterdam, 1991, na primeira coluna de poços de uma placa de microtitulação de 96 poços (Sarstedt, Newton, NC, USA), foram distribuídos 200  $\mu\text{l}$  da solução estoque

preparada de cada agente farmacológico. A partir da segunda coluna de poços foram distribuídos a cada poço de cultura 100 µl de TSB.

Foram realizadas diluições seriadas, transferindo 100 µl da primeira coluna de poços para a segunda coluna, e assim consecutivamente até obter a concentração desejada do agente farmacológico. Ao final das diluições 100 µl de uma suspensão bacteriana preparada  $1 \times 10^6$  UFC/ml foram adicionadas a todos os poços de cultura.

As placas foram incubadas a 37°C por 24 horas em agitação orbital de 130 rpm. Após o período de incubação, a concentração inibitória mínima foi considerada a menor concentração do agente farmacológico capaz de inibir o crescimento bacteriano (visualizado a olho nu).

Os controles não foram expostos a nenhum agente farmacológico. Todos os experimentos foram realizados em triplicata e em três experimentos independentes.

## **2.8 Determinação CIM- E-test**

Para a determinação CIM por E-test pelo método proposto por Varela et al., 2008, foi preparado uma suspensão bacteriana em TSB correspondendo a 0,5 na escala de Macfarland (aproximadamente-  $1,5 \times 10^8$  UFC/ml). Sobre uma placa Petri (contendo ágar Mueller-Hinton) a suspensão foi semeada com auxílio de um swab estéril em três direções, girando a placa aproximadamente 90°C.

As placas foram secas a temperatura ambiente por 10-15 minutos e, só então com a superfície completamente seca as fitas de E-test foram aplicadas com as escalas de CIM para cima. As placas foram incubadas em posição invertida a 37°C por 48 horas. Após o período de incubação, os valores de CIM foram interpretados de acordo com o guia de leitura E-teste (AB Biodisk, Solna, Suécia). A Figura 6 ilustra um exemplo de leitura de uma fita de E-test, com CIM= 1 µg/ml.

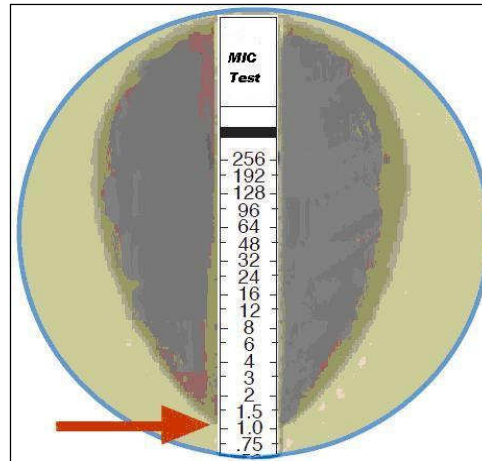


Figura 6 - Determinação CIM E-test  
[\(http://www.higlance.ru/nemnogo-teorii/\)](http://www.higlance.ru/nemnogo-teorii/)

## 2.9 Efeito pós-antibiótico (PAE)

O efeito pós-antibióticos (PAE) analisa a supressão do crescimento bacteriano que persiste após exposição das bactérias aos agentes farmacológicos (Licata, Smith, Goldschmidt, Barrett, & Froscio, 1997).

Segundo os autores Craig, 1991; Pereira et al., 2008; Gomes et al., 2011, para o controle positivo, ou seja, sem a presença de agentes farmacológicos avaliados, em um frasco de erlenmeyer foram adicionadas 30 µl de cada suspensão bacteriana preparada correspondendo a  $1 \times 10^9$  UFC/ml, acrescentando TSB para um volume final de 30 ml.

Para avaliar o efeito dos agentes farmacológicos sozinhos sobre células em suspensão, aos frascos de erlenmeyers foram adicionados 30 µl de cada suspensão bacteriana ( $1 \times 10^9$  UFC/ml) e, em seguida foram adicionadas as concentrações desejadas dos agentes farmacológicos, e ao final adicionado TSB a fim de obter um volume final de 30 ml.

Os frascos de erlenmeyers foram incubados por 1 hora a 37°C em agitação orbital de 130 rpm. Após o período de incubação as amostras (volume total- 30 ml) foram transferidas para tubos Falcon de 50 ml e, centrifugadas por 10 minutos a 4°C/9500 rpm. Os sobrenadantes foram descartados e, a biomassa de cada amostra foram ressuspendidas com 30 ml de TSB e, as amostras foram novamente transferidas a novos frascos de erlenmeyers. Os erlenmeyers ficaram sob agitação orbital de 130 rpm a 37°C.

A contagem de células viáveis foi determinada com o tempo zero e, o crescimento bacteriano monitorado a cada hora, onde 1 ml de amostra foi coletado de cada frasco dos erlenmeyers e, as amostras eram transferidas para eppendorfs. Os eppendorfs foram submetidos a diluições seriadas e, 10 µl de cada diluição foram semeadas em placas Petri, contendo TSA. As placas foram incubadas a 48 h e após o período de incubação as colônias crescidas foram contadas e foi calculado o total de unidades formadoras de colônia expressos em UFC/ml.

Os resultados do efeito pós-antibiótico foi calculado de acordo com a equação:

$$PAE = T - C$$

Onde T é o tempo requerido para crescimento de 1 log na amostra avaliada com cada agente farmacológico e, C é o tempo requerido com base no crescimento de 1 log do controle positivo.

## **2.10 Efeito do agentes farmacológicos sobre as células em biofilme**

Segundo a metodologia proposta por Cerca et al., 2005, em placas de microtitulação de 96 poços (Sarstedt, Newton, NC, USA) foram distribuídos separadamente a cada poço de cultura 200 µl de uma suspensão de células de *S. epidermidis* e *S. aureus* ( $1 \times 10^6$  UFC/ml) em

TSB suplementado com 0,25% de glicose para promover a formação do biofilme. As placas foram incubadas a 37°C, com agitação orbital de 130 rpm por 24 horas.

Após o período de incubação, os biofilmes formado a cada poço de cultura foram lavados duas vezes com 200 µl de soro fisiológico (0,9% NaCl) para remover as células planctônicas.

A cada poço de cultura contendo os biofilmes, foram transferidos 200 µl das concentrações desejadas dos agentes farmacológicos a serem avaliados sozinhos e em combinação. As placas foram novamente incubadas a 37°C, com agitação orbital de 130 rpm por 24 horas. Ao final, cada poço de cultura foram novamente lavados duas vezes com 200 µl de soro fisiológico (0,9% NaCl) e, foram realizados os ensaios de unidades formadoras de colônia (UFC), o método colorimétrico baseado na redução de XTT e o método do cristal violeta (CV).

Os controles positivos não foram expostos às concentrações de nenhum agente antimicrobiano. Todos os experimentos foram realizados em triplicata e em três experimentos independentes.

### **2.10.1 Unidades formadoras de colônia (UFC)**

Segundo Gomes et al., 2009, após cada período de incubação de exposição dos biofilmes aos agentes farmacológicos, foram transferidos 200 µl de NaCl (0,9%) em cada poço de cultura. Os poços foram raspados com auxílio de uma ponteira removendo o biofilme formado em cada poço de cultura.

A cada 5 poços de cultura foram obtidas amostras com total de 1,0 ml e transferidas para eppendorfs. Os eppendorfs foram centrifugados por 10 minutos a 4°C em 9500 g e, a biomassa foram ressuspendidas em 1,0 ml de solução salina (0,9%). As amostras foram



submetidas à sonicação (Ultrasonic Processor, Cole-Parmer, Illinois, USA) por 20 segundos com uma amplitude de 22% e, em seguida submetidas ao vórtex por alguns segundos, a fim de promover o desprendimento das células em biofilme.

A viabilidade celular foi determinada por diluição seriada das amostras em solução salina (0,9%) como ilustra a Figura 7. Ao final, 10 µl de cada diluição foram semeados pelo método da gota em placas Petri (90x15 mm) contendo TSA.

As placas foram incubadas a 37°C em estufa bacteriológica por 48 horas. As colônias crescidas foram contadas e foi calculado o total de unidades formadoras de colônia expressos em UFC/ml (Figura 8).

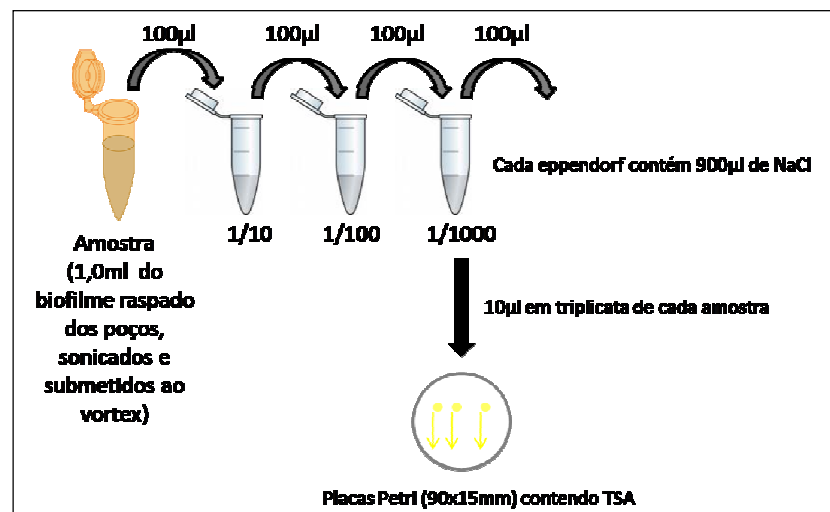


Figura 7 - Diluição seriada da amostra em NaCl



Figura 8 - Unidades formadoras de colônia (UFC/ml)

### 2.10.2 Método colorimétrico- XTT

O método colorimétrico baseado na redução de XTT ( $\{2,3\text{-bis}(2\text{-metil-4-nitro-5-sulfofenil})\text{-5-[fenilamino)carbonil]-2H-hidróxido de tetrazólio}\}$ ; Sigma, St Louis, USA) foi aplicado para avaliar a atividade do biofilme, onde o corante XTT é convertido em coloração na presença de atividade metabólica do biofilme (Kuhn, Balkis, Chandra, Mukherjee, & Ghannoum, 2003).

Segundo Gomes et al., 2009, após cada período de incubação de exposição dos biofilmes aos agentes farmacológicos, a cada poço de cultura foram transferidos 200  $\mu\text{l}$  de uma solução contendo 200  $\text{mg l}^{-1}$  de XTT e 20  $\text{mg l}^{-1}$  de PMS (fenazina metosulfato) (Sigma).

As placas de microtitulação foram incubadas por 3 horas a 37°C no escuro e, em agitação orbital de 130 rpm. A absorbância foi realizada em 490nm.

### **2.10.3 Cristal violeta (CV)**

O método do cristal violeta (Sigma) foi utilizado para indicar a biomassa total do biofilme. Segundo Gomes et al., 2009, após o período de incubação de exposição dos biofilmes aos agentes farmacológicos nas concentrações avaliadas, foram transferidos 200 µl de metanol a cada poço de cultura permitindo sua ação por 15 minutos. Em seguida, o metanol foi removido e o corante cristal violeta 1% foi adicionado, permanecendo por 5 minutos. Posteriormente, as células em biofilme foram lavadas com água e ao final adicionado ácido acético 33%. A absorbância foi realizada em 570 nm.

### **2.11 Extração da matriz do biofilme com resina de permuta catiônica (Resina Dowex)**

Segundo, Sousa; Teixeira; Oliveira, 2009, em placas de microtitulação de 6 poços (Sarstedt, Newton, NC, USA), foram distribuídos separadamente a cada poço de cultura 4 ml de uma suspensão de células de *S. epidermidis* ( $1 \times 10^6$  UFC/ml) em TSB suplementado com 0,25% de glicose para promover a formação do biofilme. As placas foram incubadas a 37°C, com agitação orbital de 130 rpm por 24 horas. Após o período de incubação, cada poço de cultura contendo o biofilme formado, foram lavados duas vezes com 4 ml de soro fisiológico (0,9% NaCl) para remover as células planctônicas.

A cada poço de cultura contendo os biofilmes, foram transferidos 4 ml das concentrações desejadas dos agentes farmacológicos a serem avaliados. As placas foram novamente incubadas a 37°C, com agitação orbital de 130 rpm por 24 horas. Os controles positivos não foram expostos às concentrações dos agentes testados.

Após o período de incubação, cada poço de cultura foram novamente lavados duas vezes com 4 ml de soro fisiológico (0,9% NaCl). Foram transferidos a cada poço de cultura 4

ml de tampão PBS (pH 7,0) e, os biofilmes formados a cada poço foram removidos com auxílio de um raspador (cell scraper/ zellschaber/ 24 cm).

As amostras obtidas foram transferidas para tubos Falcon (15 ml) e centrifugadas por 5 minutos a 4°C a 9500 rpm. Após a centrifugação, os sobrenadantes foram desprezados, adicionando a biomassa de cada amostra 1 g de resina (Dowex/50X8, Na<sup>+</sup> form, 20-50 mesh, Aldrich-Fluka 44445) com 5 ml de tampão extração (2 mM Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>; 4 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 9 mM NaCl and 1 mM KCl, pH 7.0). As amostras foram submetidas ao vórtex e incubadas por 2 horas a -5°C em agitação orbital de 130 rpm.

Após o período de incubação as amostras foram submetidas à centrifugação por 20 minutos a 4°C a 9500 g. Após a centrifugação, os sobrenadantes foram transferidos para tubos Falcon (15 ml) para serem utilizados nos ensaios de quantificação de proteínas e polissacarídeos. As biomassas foram descartadas.

### **2.11.1 Quantificação de proteínas**

Segundo, Sousa; Teixeira; Oliveira, 2009, a quantidade de proteínas extraídas da matriz dos biofilmes foi determinada pelo método do ácido bicinonínico (Bicinchoninic Acid Protein Assay Kit (BCA) (Sigma)) utilizando BSA (bovine serum albumin) como padrão.

Foram transferidos separadamente para uma placa de microtitulação de 96 poços (Sarstedt, Newton, NC, USA), 25 µl de cada amostra obtida na extração da matriz, em triplicata.

A cada poço de cultura contendo 25 µl de cada amostra, adicionou-se 200 µl de uma solução trabalho composta por 50 partes de solução BCA e uma parte de solução BCB (soluções do Kit).

As placas de microtitulação foram incubadas por 30 minutos a 37°C em agitação orbital de 130 rpm. A absorbância foi realizada em 562nm.

### **2.11.2 Quantificação de polissacarídeos totais**

Segundo Dubois et al., 1956; Sousa; Teixeira; Oliveira, 2009, em tubos de vidro, foram transferidos 500 µl separadamente de cada amostra obtida na extração da matriz, em triplicata.

A cada tubo de vidro, foram adicionados 0,5 ml de fenol aquoso (5% p/v). As amostras foram agitadas e, em seguida foram transferidos 2,5 ml de ácido sulfúrico concentrado (95-97%). Os tubos de vidro foram mantidos a temperatura ambiente até o arrefecimento das amostras.

Após o arrefecimento, foram transferidos separadamente e, em triplicata 200 µl de cada amostra para poços de cultura de uma placa de microtitulação de 96 poços (Sarstedt, Newton, NC, USA). A absorbância foi realizada em 490 nm. A concentração de polissacarídeos foi determinada através da curva de calibração.

### **2.12 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)**

Segundo, Sousa et al. (2008), em placas de microtitulação de 12 poços (Sarstedt, Newton, NC, USA), foram transferidos 2 ml de uma suspensão de células ( $1 \times 10^6$  UFC/ml) em TSB suplementado com 0,25% de glicose para promover a formação do biofilme. As placas foram incubadas a 37°C, com agitação orbital de 130 rpm por 24 horas. No final, cada poço de cultura contendo o biofilme formado, foram lavados duas vezes com 2,0 ml de soro fisiológico (0,9% NaCl) para remover as células planctônicas.

A cada poço de cultura, foram transferidos 2 ml das concentrações desejada dos agentes farmacológicos. As placas foram novamente incubadas a 37°C, com agitação orbital a 130 rpm por 24 horas. Após o período de incubação, cada poço de cultura foram novamente lavados duas vezes com 2 ml de soro fisiológico (0,9% NaCl).

Cada poço de cultura contendo o biofilme formado, foram mantidos a temperatura ambiente e após as superfícies completamente secas, os poços foram cortados a fim de obter corpos-de-prova.

Os corpos-de-prova foram desidratados por 15 minutos de imersão em concentrações crescentes de etanol (70, 95 e 100%). Ao final, as amostras foram colocadas em um dessecador selado.

As amostras foram montadas em suportes de alumínio, revestidas com ouro e observadas com uma Leica Cambridge S-360 microscópio eletrônico de varredura (Leo, Cambridge, UK).

Os controles positivos não foram expostos às concentrações de nenhum agente farmacológico. Todos os experimentos foram realizados em e em três experimentos independentes.

### **2.13 Efeito do agentes farmacológicos sobre as células planctônicas**

Segundo o método proposto por Gomes et al. (2009), para o controle positivo, sem a presença de agentes farmacológicos, em frascos de erlenmeyer foram adicionadas 1,5 ml de cada suspensão bacteriana separadamente correspondendo a  $1 \times 10^9$  UFC/ml, acrescentando 13,5 ml de TSB, totalizando um volume final de 15 ml.

Para avaliar o efeito dos agentes farmacológicos sozinhos sobre células planctônicas, aos frascos de erlenmeyers foram adicionados 1,5 ml de cada suspensão bacteriana ( $1 \times 10^9$

UFC/ml) e, em seguida foram adicionadas as concentrações desejadas dos agentes farmacológicos, e ao final adicionado TSB a fim de obter um volume final de 15 ml.

Todos os frascos de erlenmeyers foram incubados por 24 horas a 37°C com agitação orbital de 130 rpm. Após o período de incubação foram realizados os ensaios de unidades formadoras de colônia (UFC) e o método colorimétrico baseado na redução de XTT.

Todos os experimentos foram realizados em triplicata e em três experimentos independentes.

### **2.13.1 Unidades formadoras de colônia (UFC)**

Segundo Gomes et al. (2009), para determinar o número de unidades formadoras de colônia (UFC), após o período de incubação (24 h) dos frascos de erlenmeyers, foram coletados 1 ml de cada amostra e, transferidos para eppendorfs.

Os eppendorfs foram centrifugados por 10 minutos a 4°C em 9500 g e, a biomassa de cada amostra foram ressuspendidas em 1 ml de solução salina (0,9%). As amostras foram submetidas à sonicação (Ultrasonic Processor, Cole-Parmer, Illinois, USA) por 20 segundos com uma amplitude de 22% e, em seguida submetidas ao vórtex por alguns segundos.

A viabilidade das células planctônicas foram determinadas por meio de diluições seriadas da amostra em solução salina (0,9%) e, 10 µl de cada diluição foram semeados em placas Petri (90x15 mm) contendo TSA. As placas foram incubadas a 37°C em estufa bacteriológica por 48 horas. As colônias crescidas foram contadas e foi calculado o total de unidades formadoras de colônia expressos em UFC/ml.

### **2.13.2 Método colorimétrico- XTT**

Segundo Gomes et al. (2009), a atividade metabólica das células planctônicas aos agentes farmacológicos avaliados sozinhos foram determinadas pelo método colorimétrico XTT. Após o período de incubação (24 h) dos frascos de erlenmeyers, foram transferidos 1 ml de cada amostra para eppendorfs.

Os eppendorfs foram centrifugados por 10 minutos a 4°C em 9500 g. A biomassa foi ressuspendida em 1 ml de solução salina (0,9%). Destas amostras 150 µl foram transferidos separadamente para poços de cultura de placas de microtitulação contendo 96 poços (Sarstedt, Newton, NC, USA) e, ao final adicionado 50 µl de uma solução contendo 200 mg l<sup>-1</sup> de XTT e 20 mg l<sup>-1</sup> de PMS (fenazina metosulfato) (Sigma) a cada poço de cultura.

As placas de microtitulação foram incubadas por 3 horas a 37°C no escuro e, em agitação orbital de 130 rpm. A absorbância foi realizada em 490nm.

### **2.14 Análise estatística**

Os resultados obtidos foram avaliados usando One-Way análise de variância (ANOVA) por aplicação do teste Tukey's usando o software SPSS (Statistical Package for the Social Sciences). Com um nível de significância de 95%.



# **Capítulo III**

## **Resultados**

### 3. Resultados

#### 3.1 Isolados clínicos de *S. epidermidis* e *S. aureus*

##### 3.1.1 Ágar vermelho Congo

Os resultados da produção de *slime* nas cepas avaliadas de *S. epidermidis* e *S. aureus* estão apresentadas na Tabela 2.

Tabela 2 - Produção de *slime* das cepas de estafilococos observado por meio do método ágar vermelho Congo

Cepa	Número de identificação laboratorial	Ágar vermelho Congo (Colônias negras/vermelhas)
<i>S. epidermidis</i>	1	Vermelha
	127	Negra
	165	Vermelha
	1457	Negra
	9142	Negra
<i>S. aureus</i>	2	Negra
	35	Negra
	73	Negra
	173	Negra
	174	Negra

Colônias negras indicam a produção de polissacarídeo extracelular (Figura 9-A) e, colônias vermelhas são consideradas *slime* negativo (Figura 9-B). Conforme observado na Tabela 2, a produção do polissacarídeo extracelular foi produzido por todos os isolados clínicos de *S. aureus* (100%) avaliados. Dentre as cepas avaliadas de *S. epidermidis*, em 2

isolados clínicos (1 e 165) não foi observado a produção de polissacarídeo extracelular e, 80% dos isolados de *S. epidermidis* produziram *slime*.

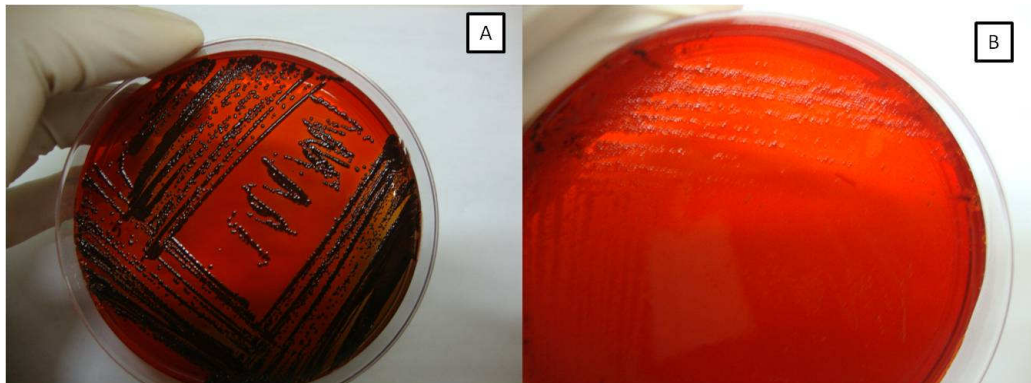


Figura 9 - Produção de *slime* (A) por estafilococos e, *slime* negativo (B)

### 3.1.2 Detecção do gene *icaD*

A presença do gene *icaD* foi detectada em todas as cepas de *S. epidermidis* (1, 127, 165, 1457 e 9142) e todas as cepas de *S. aureus* (2, 35, 73, 173 e 174), conforme mostra a Figura 10.

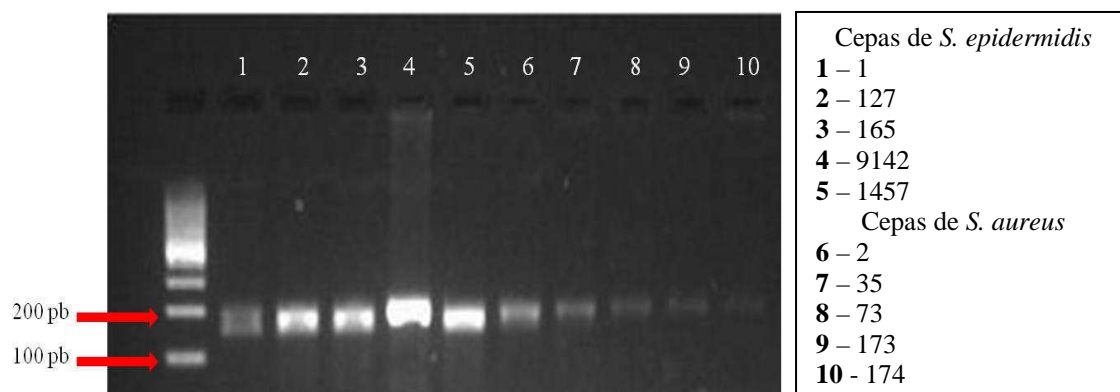


Figura 10 - Detecção do gene *icaD* nos isolados de *S. epidermidis* e *S. aureus*

### 3.2 Agentes farmacológicos avaliados sozinhos

#### 3.2.1 N-acetilcisteína (NAC)

##### 3.2.1.1 Concentração inibitória mínima (CIM)

A Tabela 3 mostra as concentrações inibitórias mínimas do NAC nas cepas de *S. epidermidis* e *S. aureus*.

Tabela 3 - Concentrações inibitórias mínimas do NAC nas cepas de *S. epidermidis* e *S. aureus*

Cepa	Número de identificação laboratorial	CIM
<i>S. epidermidis</i>	1	8 mg/ml
	127	8 mg/ml
	165	8 mg/ml
	1457	4 mg/ml
	9142	4 mg/ml
<i>S. aureus</i>	2	8 mg/ml
	35	8 mg/ml
	73	8 mg/ml
	173	8 mg/ml
	174	8 mg/ml

O NAC foi avaliado contra células em biofilme e células planctônicas na concentração CIM e 10xCIM.

### 3.2.1.2 Efeito do NAC sobre as células de estafilococos em biofilme

#### 3.2.1.2.1 Unidades formadoras de colônia (UFC)

Os resultados do efeito das concentrações de NAC avaliadas (CIM e 10xCIM) sobre as células em biofilme de *S. epidermidis* e *S. aureus* estão apresentados respectivamente nas Figuras 11 e 12.

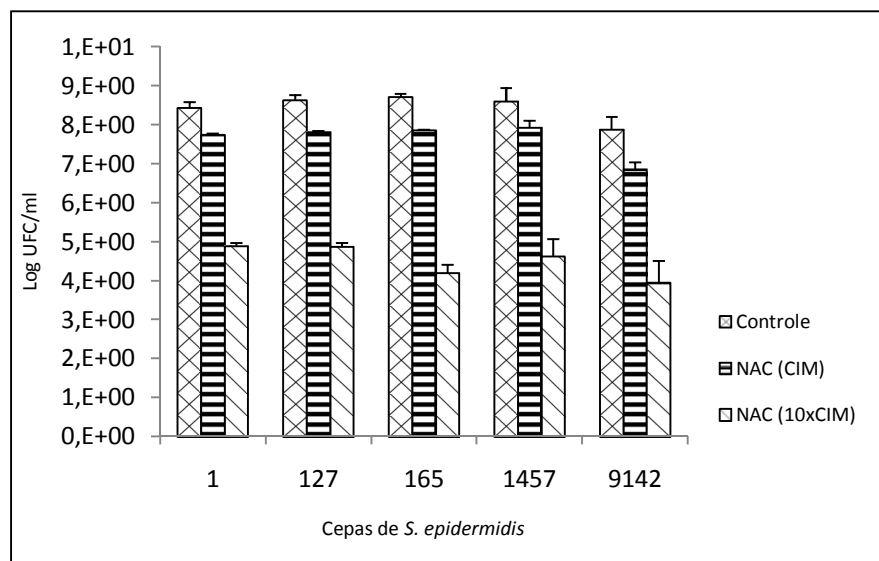


Figura 11 - Efeito do NAC nas concentrações CIM e 10xCIM sobre as células em biofilme de *S. epidermidis*

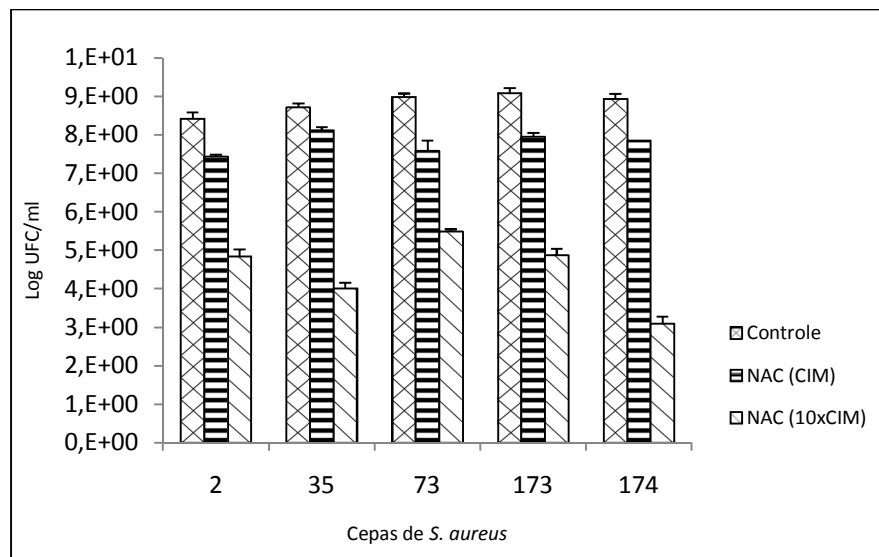


Figura 12 - Efeito do NAC nas concentrações CIM e 10xCIM sobre as células em biofilme de *S. aureus*

As Figuras 11-12 mostram o efeito do NAC (CIM e 10xCIM) sobre as células de estafilococos em biofilme. Para todas as cepas avaliadas foi observada diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ) contra as duas concentrações de NAC avaliadas. O uso de NAC 10xCIM mostrou uma diminuição significativa de células viáveis de *S. epidermidis* e *S. aureus* de aproximadamente 4-5  $\log_{10}$  UFC/ml, enquanto que o uso de NAC na concentração CIM diminuiu cerca de 1-2  $\log_{10}$  UFC/ml em todas as cepas de estafilococos avaliadas.

### 3.2.1.2.2 Método colorimétrico- XTT

Os resultados da atividade celular de *S. epidermidis* e *S. aureus* em biofilme tratados com NAC (CIM e 10xCIM) estão apresentados respectivamente nas Figuras 13 e 14.

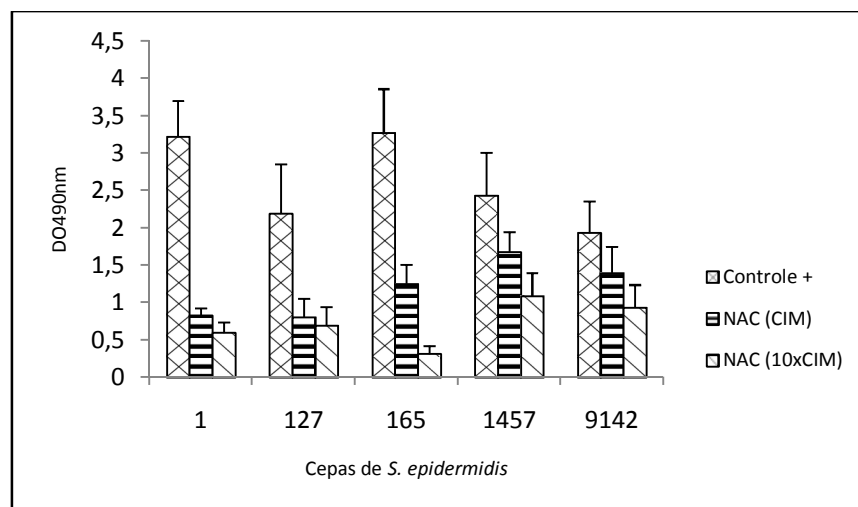


Figura 13 - Atividade celular expressa pelo XTT após tratamento com NAC (CIM e 10xCIM) sobre células em biofilme de *S. epidermidis*

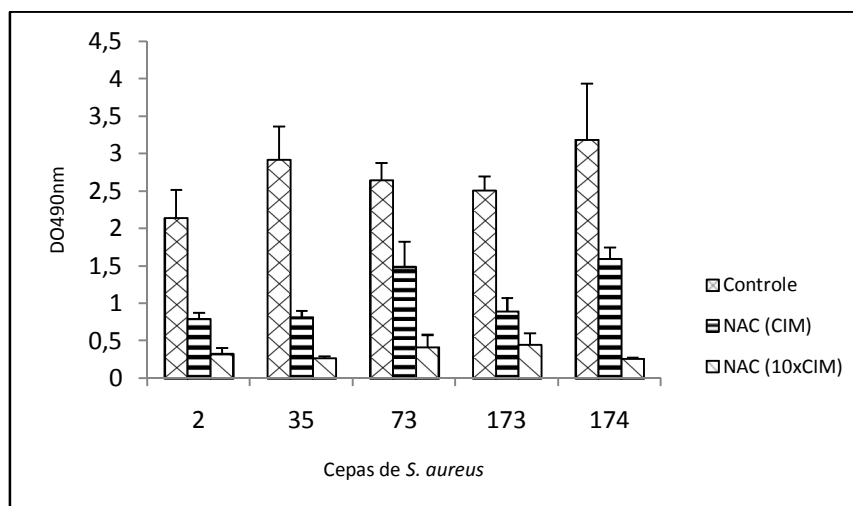


Figura 14 - Atividade celular expressa pelo XTT após tratamento com NAC (CIM e 10xCIM) sobre células em biofilme de *S. aureus*

Os resultados da atividade metabólica das células de estafilococos em biofilme apresentados nas Figuras 13 e 14, mostraram uma diminuição da atividade celular em todas as cepas avaliadas ( $p < 0,05$ ) quando tratadas com as duas concentrações de NAC. Quando as cepas são tratadas com NAC 10xCIM foi observado uma maior diminuição da atividade celular em ambas as cepas de estafilococos avaliadas, com exceção da cepa 127 de *S. epidermidis* que não mostrou diferença significativa entre as duas concentrações de NAC avaliadas.

### 3.2.1.2.3 Cristal violeta (CV)

Os resultados da biomassa total dos biofilmes de *S. epidermidis* (1457 e 9142) e tratados com NAC (CIM e 10xCIM) estão apresentados na Figura 15.

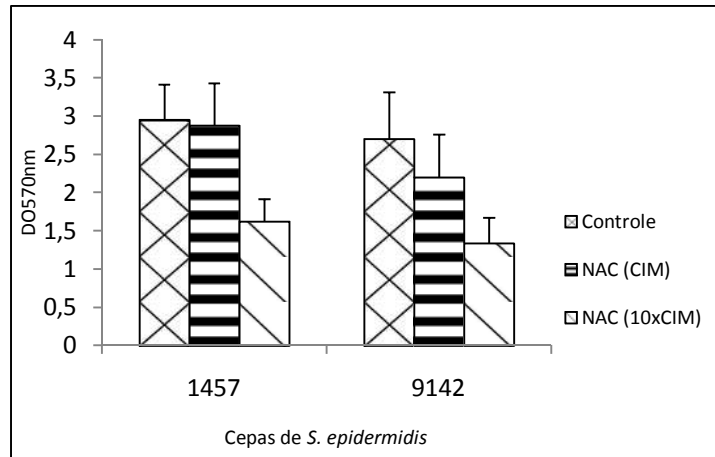


Figura 15 - Biomassa total após tratamento com NAC (CIM e 10xCIM) sobre células em biofilme de *S. epidermidis*

A Figura 15 mostra o efeito do NAC sobre a biomassa das células de *S. epidermidis* e, foram observadas diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) na diminuição da biomassa das duas cepas avaliadas quando tratadas com NAC 10xCIM.

A concentração CIM para ambas as cepas avaliadas não mostrou diferença estatística comparada com o controle positivo.

### 3.2.1.3 Extração da matriz do biofilme

A Figura 16 mostra a quantidade de proteínas e polissacarídeos extraídos da matriz dos biofilmes de *S. epidermidis* (1457 e 9142) após tratamento com NAC (CIM e 10xCIM).

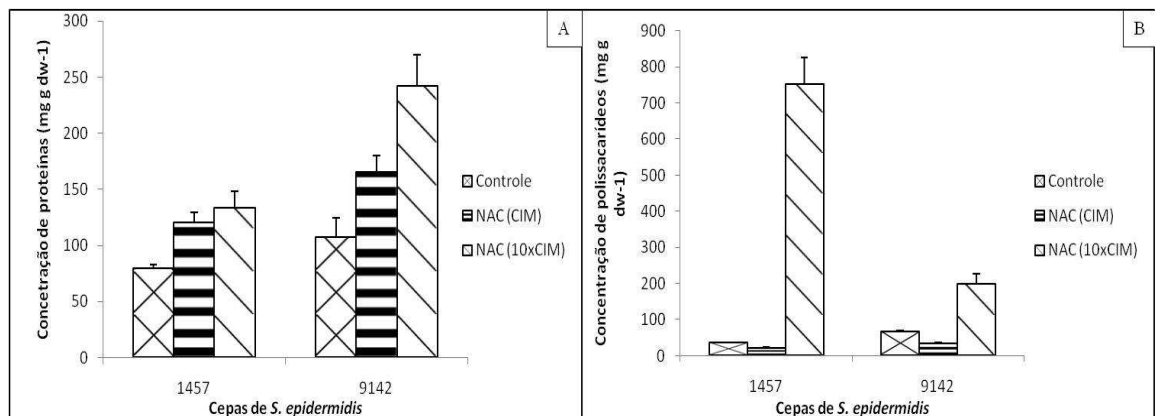


Figura 16 - Quantificação de proteínas (A) e polissacarídeos (B) da matriz dos biofilmes de *S. epidermidis* após tratamento com NAC (CIM e 10xCIM)



A composição da matriz mostrou um aumento geral e significativo ( $p < 0,05$ ) na quantidade de proteínas e polissacarídeos após tratamento dos biofilmes com NAC, apresentado na Figura 16. A quantidade de proteínas aumentou após tratamento com NAC independente da concentração avaliada (CIM e 10xCIM). No entanto a quantidade de polissacarídeos teve um aumento significativo nas duas cepas avaliadas quando tratadas com NAC 10xCIM ( $p < 0,05$ ).

#### **3.2.1.4 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)**

A Figura 17 apresenta micrografias eletrônicas de varredura das células em biofilme de *S. epidermidis* (1457) tratadas com NAC nas concentrações CIM e 10xCIM.

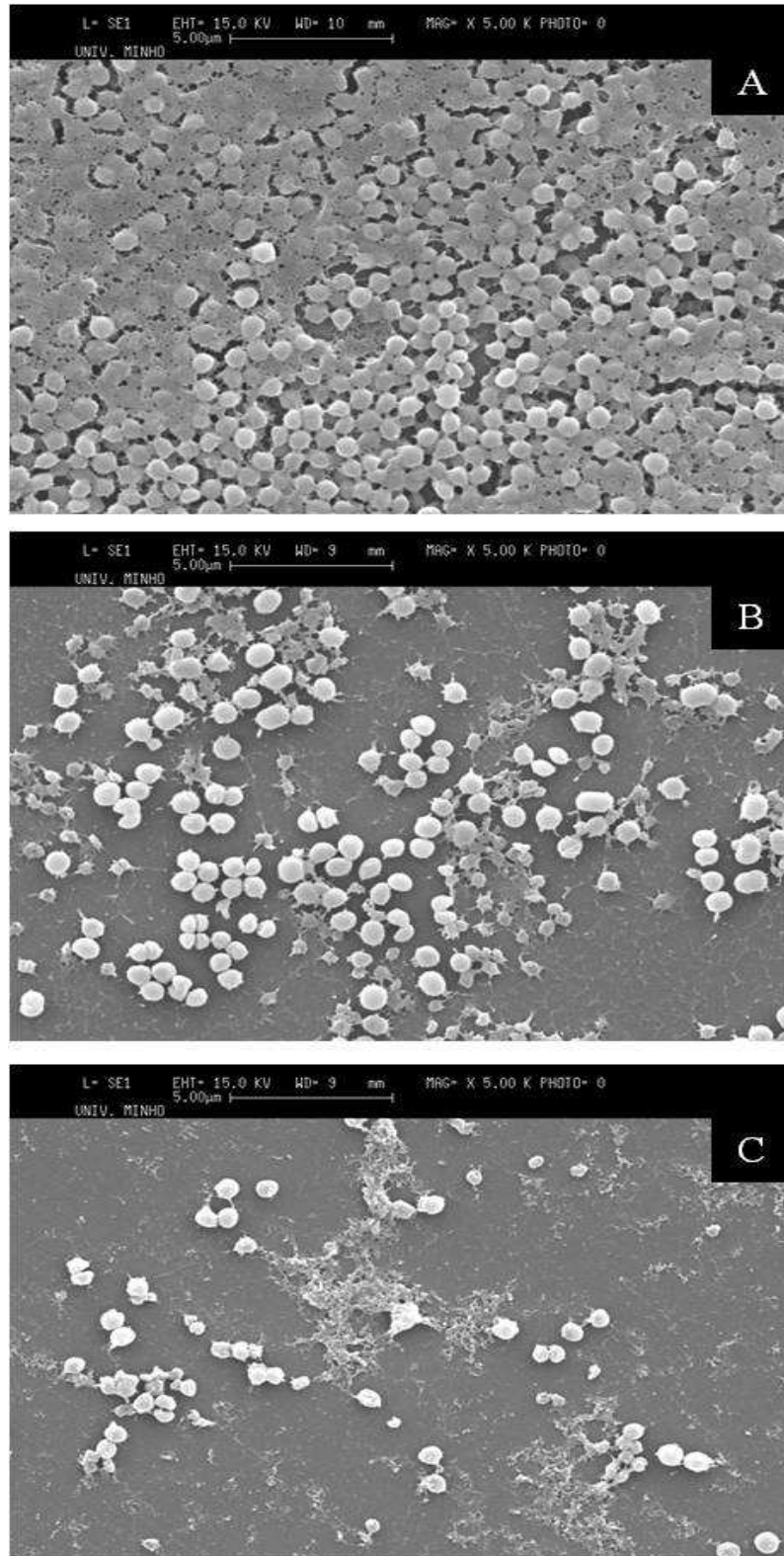


Figura 17 - Micrografias eletrônicas de varreduras (MEV) do biofilme de *S. epidermidis* (1457): Controle positivo (A), após tratamento com NAC CIM (B) e NAC 10xCIM (C). A barra nas imagens correspondem a 5  $\mu$ m. (Leica Cambridge S-360)

As micrografias eletrônicas de varredura confirmam os resultados obtidos por meio dos métodos quantitativos. Após tratamento com NAC na concentração CIM (Figura 17-B), mostrou uma diminuição das células e menor quantidade de matriz extracelular. No entanto após tratamento do biofilme com NAC 10xCIM (Figura 17-C) observa-se uma diminuição significativa das células e pouca quantidade de matriz extracelular, comparada com o controle (Figura 17-A).

### 3.2.1.5 Efeito do NAC sobre as células planctônicas de *S. epidermidis*

#### 3.2.1.5.1 Unidades formadoras de colônia (UFC)

Os resultados do efeito das concentrações de NAC (CIM e 10xCIM) sobre as células planctônicas de *S. epidermidis* (1457 e 9142) estão apresentados na Figura 18.

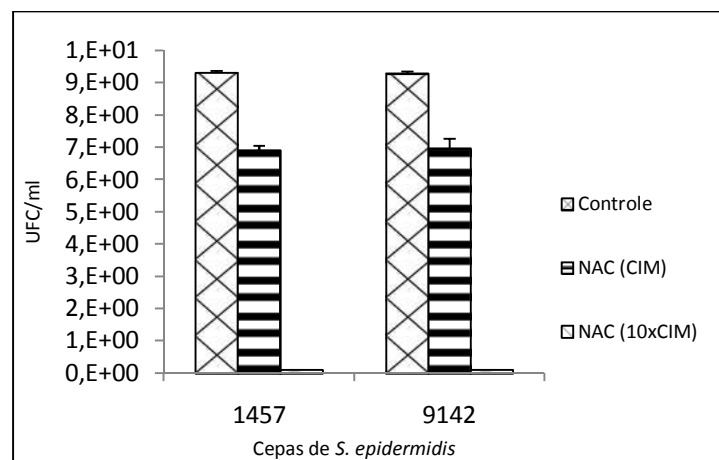


Figura 18 - Efeito do NAC nas concentrações CIM e 10xCIM sobre as células planctônicas de *S. epidermidis*

A Figura 18 mostra o efeito significativo ( $p < 0,05$ ) do tratamento das células planctônicas com NAC (CIM e 10xCIM). O uso de NAC na concentração CIM mostrou uma diminuição significativa de células viáveis de *S. epidermidis* de aproximadamente 2-3  $\log_{10}$  UFC/ml, no entanto, o uso de NAC 10xCIM foi bactericida para as células planctônicas de *S. epidermidis* avaliadas.

### 3.2.1.5.2 Método colorimétrico- XTT

Os resultados da atividade celular das células planctônicas de *S. epidermidis* (1457 e 9142) tratados com NAC (CIM e 10xCIM) estão apresentados na Figura 19.

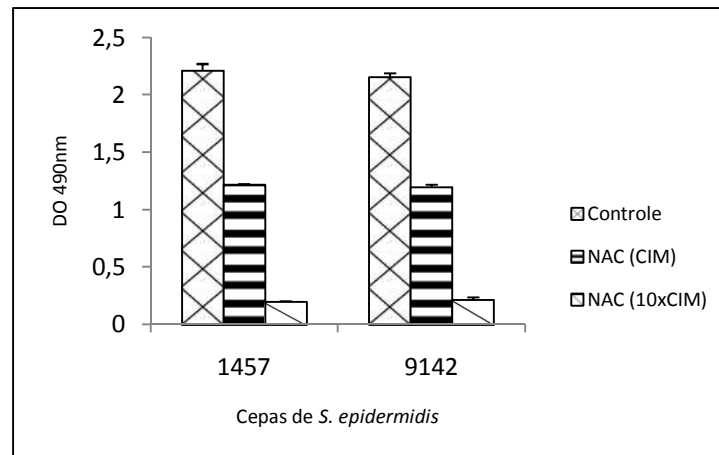


Figura 19 - Atividade celular expressa pelo XTT após tratamento com NAC (CIM e 10xCIM) sobre células planctônicas de *S. epidermidis*

Os resultados da atividade metabólica das células planctônicas apresentados na Figura 19, mostraram uma diminuição da atividade celular em ambas as cepas avaliadas. As duas concentrações de NAC avaliadas mostraram diminuição significativa ( $p < 0,05$ ) da atividade celular. No entanto, quando tratadas com NAC 10xCIM é observada pouca atividade metabólica das células planctônicas comparadas ao controle.

### 3.2.2 Rifampicina

#### 3.2.2.1 Concentração inibitória mínima (CIM)

A Tabela 4 mostra as concentrações inibitórias mínimas da rifampicina nas células de *S. epidermidis* (1457 e 9142).

Tabela 4 - Concentrações inibitórias mínimas da rifampicina nas cepas de *S. epidermidis*

	<i>S. epidermidis</i> (1457)	<i>S. epidermidis</i> (9142)
<b>CIM</b>	0,015 mg/l	0,015 mg/l

De acordo com Cerca et al. (2005) o valor da rifampicina na concentração máxima no soro (Cmax) corresponde a 10 mg/l.

#### 3.2.2.2 Efeito pós-antibiótico (PAE)

O efeito pós- antibiótico (PAE) das cepas de *S. epidermidis* (1457 e 9142) estão apresentados na Tabela 5.

Tabela 5 - PAE da rifampicina expresso após contato com células de *S. epidermidis*

	<i>S. epidermidis</i> (1457)	<i>S. epidermidis</i> (9142)
<b>PAE</b>	2 horas	3 horas

O efeito pós- antibiótico apresentado na Tabela 5 mostra que ambas as cepas de *S. epidermidis* avaliadas apresentam um PAE curto com 2-3 horas.

### 3.2.2.3 Efeito da rifampicina sobre as células de *S. epidermidis* em biofilme

#### 3.2.2.3.1 Unidades formadoras de colônia (UFC)

Os resultados do efeito das concentrações avaliadas de rifampicina (CIM e concentração máxima no soro) sobre as células em biofilme de *S. epidermidis* (1457 e 9142) estão apresentados na Figura 20.

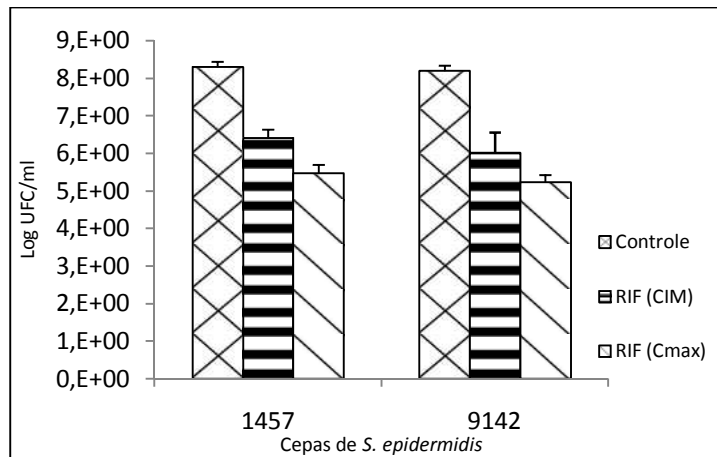


Figura 20 - Efeito da rifampicina (RIF) na concentração CIM e concentração máxima no soro (Cmax) sobre as células em biofilme de *S. epidermidis*

O efeito da rifampicina sobre as células em biofilme de *S. epidermidis* (1457 e 9142) apresentado na Figura 20 mostrou diferença estatística significativa entre as concentrações de rifampicina avaliadas comparadas com o controle ( $p < 0,05$ ). O uso de rifampicina na concentração CIM diminuiu cerca de 2  $\log_{10}$  UFC/ml em ambas as cepas e, o uso de rifampicina na concentração máxima no soro mostrou uma diminuição similar com uma diminuição de células viáveis em ambas as cepas de aproximadamente 3  $\log_{10}$  UFC/ml.

### 3.2.2.3.2 Método colorimétrico- XTT

Os resultados da atividade celular de *S. epidermidis* em biofilme tratados com rifampicina estão apresentados na Figura 21.

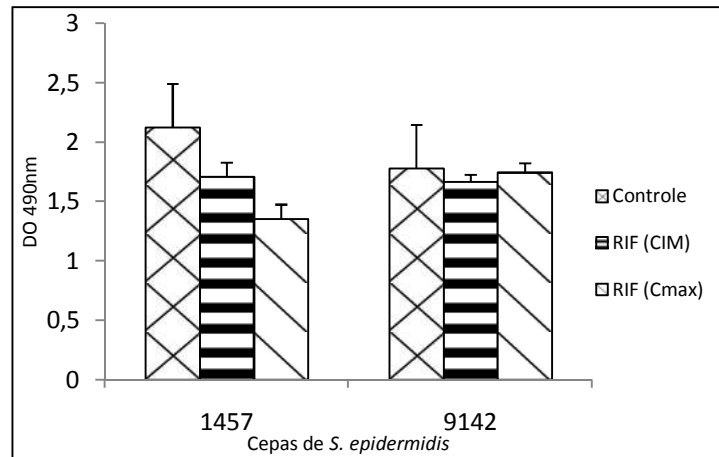


Figura 21 - Atividade celular expressa pelo XTT após tratamento com rifampicina (RIF) na concentração CIM e concentração máxima no soro (Cmax) sobre células em biofilme de *S. epidermidis*

Os resultados da atividade metabólica das células de *S. epidermidis* (1457 e 9142) em biofilme apresentados na Figura 21, mostrou uma diminuição significativa da atividade celular na cepa de *S. epidermidis* 1457 ( $p < 0,05$ ) com tratamento de ambas as concentrações de rifampicina. No entanto, a cepa 9142 de *S. epidermidis* não mostrou diminuição estatística de atividade metabólica entre as concentrações de rifampicina avaliadas e comparadas com o controle.

### 3.2.2.3.3 Cristal violeta (CV)

Os resultados da biomassa total dos biofilmes de *S. epidermidis* (1457 e 9142) tratados com rifampicina estão apresentados na Figura 22.

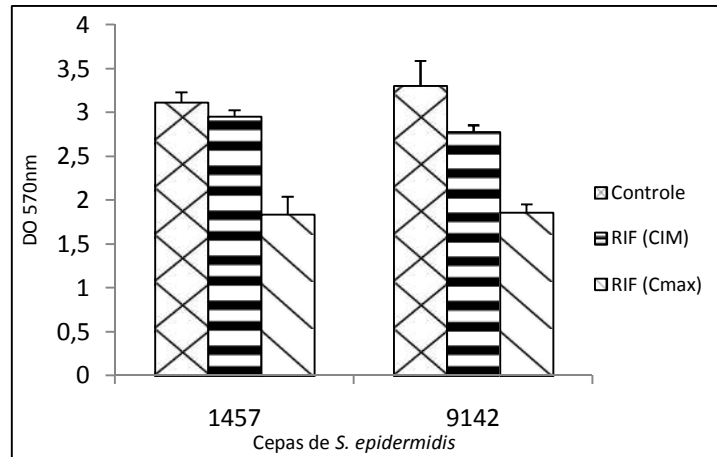


Figura 22 - Biomassa total após tratamento com rifampicina (RIF) na concentração CIM e na concentração máxima no soro (Cmax) sobre células em biofilme de *S. epidermidis*

A Figura 22 mostra o efeito da rifampicina sobre a biomassa das células e, houve diferença estatística entre as concentrações avaliadas e com o controle para ambas as cepas de *S. epidermidis* ( $p < 0,05$ ). O uso de rifampicina na concentração máxima no soro (Cmax) mostrou uma maior diminuição da biomassa para ambas as cepas.

#### 3.2.2.4 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

As micrografias eletrônicas de varredura das células de *S. epidermidis* (1457) em biofilme tratadas com rifampicina na concentração máxima no soro estão apresentadas na Figura 23.



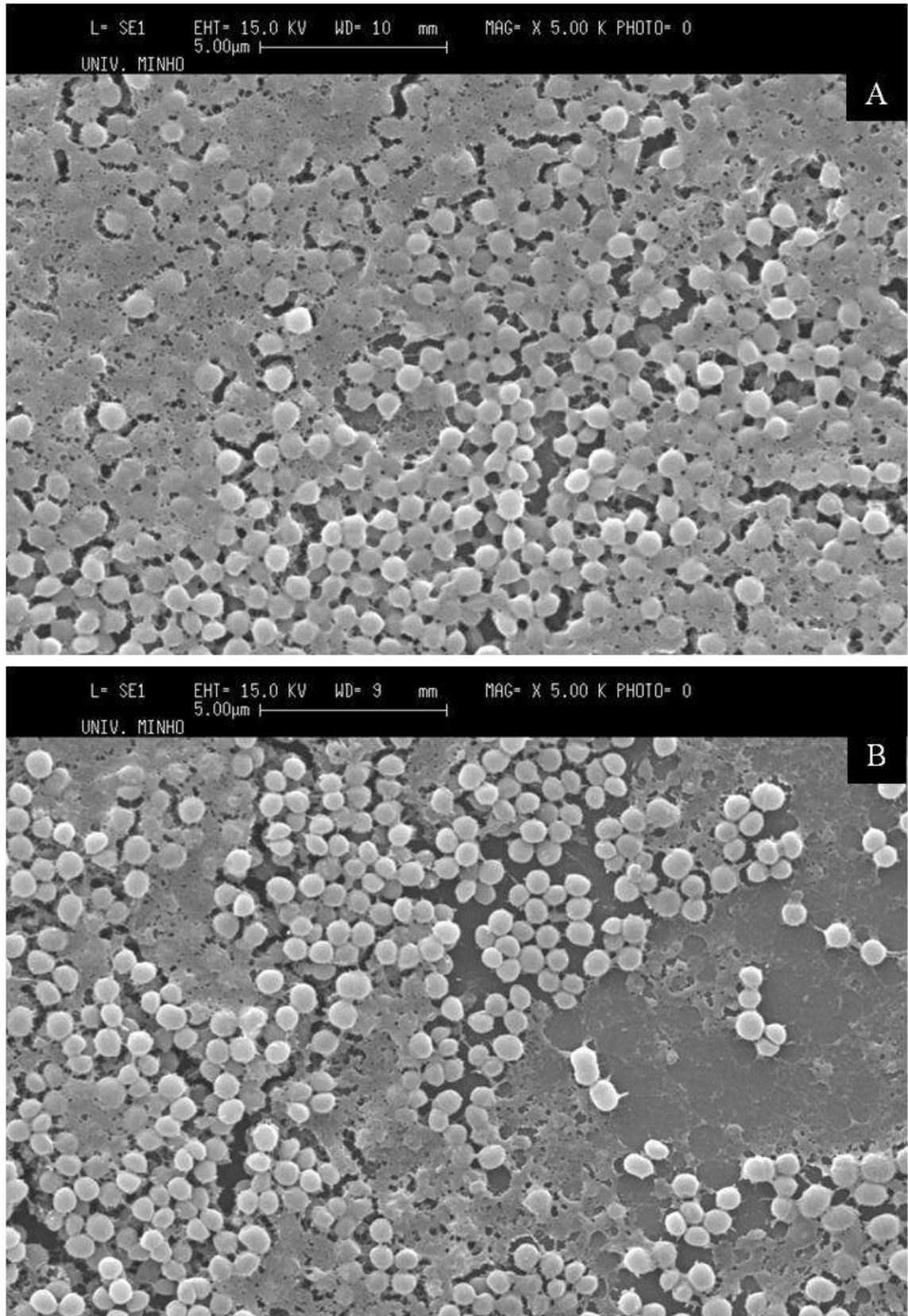


Figura 23 - Micrografias eletrônicas de varreduras (MEV) do biofilme de *S. epidermidis* (1457): Controle positivo (A), após tratamento com rifampicina na concentração máxima no soro (B). A barra nas imagens correspondem a 5 µm. (Leica Cambridge S-360)

As micrografias eletrônicas de varredura mostraram que houve uma pequena diminuição das células viáveis e do polissacarídeo extracelular quando tratadas com rifampicina na concentração máxima no soro (Figura 23-B).

### 3.2.3 Linezolida

#### 3.2.3.1 Concentração inibitória mínima (CIM)

A Tabela 6 mostra as concentrações inibitórias mínimas do linezolida nas cepas de *S. epidermidis* (1457 e 9142).

Tabela 6 - Concentrações inibitórias mínimas do linezolida nas cepas de *S. epidermidis*

	<i>S. epidermidis</i> (1457)	<i>S. epidermidis</i> (9142)
<b>CIM</b>	1 µg/ml	1 µg/ml

De acordo com Prydal et al. (2005) o valor da concentração máxima no soro (Cmax) do linezolida corresponde a 18 µg/ml.

#### 3.2.3.2 Efeito do linezolida sobre as células de *S. epidermidis* em biofilme

##### 3.2.3.2.1 Unidades formadoras de colônia (UFC)

Os resultados do efeito das concentrações avaliadas do linezolida (CIM e concentração máxima no soro) sobre as células em biofilme de *S. epidermidis* estão apresentados na Figura 24.

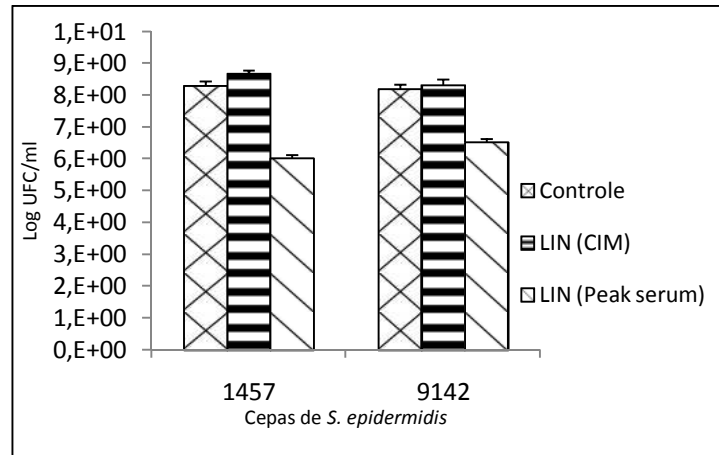


Figura 24 - Efeito do linezolida (LIN) na concentração CIM e na concentração máxima no soro (Cmax) sobre as células em biofilme de *S. epidermidis*

O uso do agente antimicrobiano linezolida sobre as células em biofilme apresentados na Figura 24, mostrou uma diminuição significativa ( $p < 0,05$ ) das células viáveis de ambas as cepas de *S. epidermidis* quando tratadas com linezolida na concentração máxima no soro, a diminuição observada é cerca de 2-3  $\log_{10}$  UFC/ml. O uso de linezolida na concentração CIM não mostrou diminuição significativa de células viáveis para ambas as cepas avaliadas.

### 3.2.3.2 Método colorimétrico- XTT

Os resultados da atividade celular de *S. epidermidis* em biofilme tratados com linezolida estão apresentados na Figura 25.

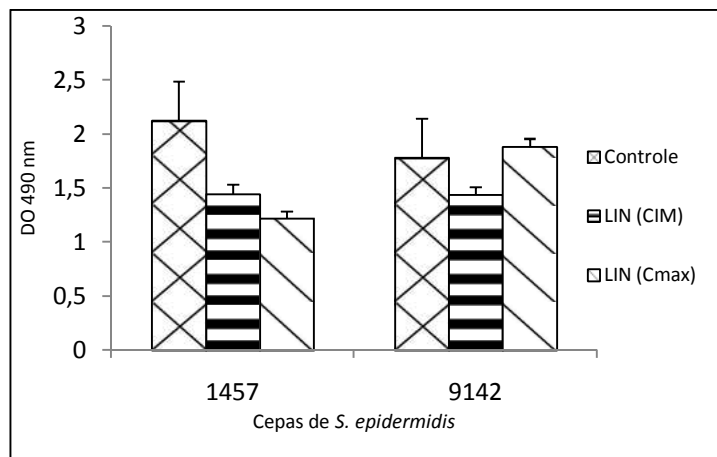


Figura 25 - Atividade celular expressa pelo XTT após tratamento com linezolida (LIN) na concentração CIM e na concentração máxima no soro (Cmax) sobre células em biofilme de *S. epidermidis*

A atividade das células em biofilme apresentadas na Figura 25, mostrou uma diminuição significativa da atividade das células de *S. epidermidis* 1457 em ambas as concentrações de linezolida avaliadas ( $p < 0,05$ ) e, sobre a cepa 9142 foi observada uma diminuição significativa da atividade das células quando tratadas com linezolida na concentração CIM ( $p < 0,05$ ).

### 3.2.3.2.3 Cristal violeta (CV)

Os resultados da biomassa total dos biofilmes de *S. epidermidis* (1457 e 9142) tratados com linezolida estão apresentados na Figura 26.

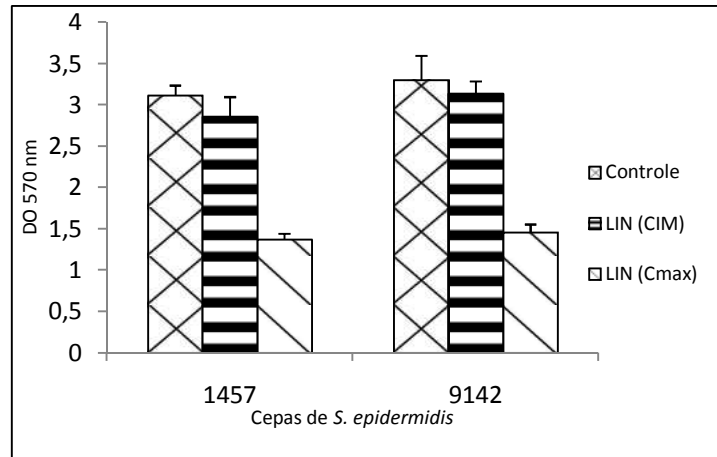


Figura 26 - Biomassa total após tratamento com linezolida (LIN) na concentração CIM e na concentração máxima no soro (Cmax) sobre células em biofilme de *S. epidermidis*

A biomassa total dos biofilmes de *S. epidermidis* apresentadas na Figura 26, mostrou que o uso de linezolida na concentração máxima no soro diminuiu significativamente a biomassa celular de ambas as cepas avaliadas ( $p < 0,05$ ). O uso de linezolida na concentração CIM não mostrou diminuição significativa da biomassa celular dos biofilmes de *S. epidermidis* avaliados.

### 3.2.4 Daptomicina

#### 3.2.4.1 Concentração inibitória mínima (CIM)

A Tabela 7 mostra as concentrações inibitórias mínimas da daptomicina nas cepas de *S. epidermidis* (1457 e 9142).

Tabela 7 - Concentrações inibitórias mínimas da daptomicina nas cepas de *S. epidermidis*

	<i>S. epidermidis</i> (1457)	<i>S. epidermidis</i> (9142)
<b>CIM</b>	0,5 µg/ml	0,25 µg/ml

De acordo com Murillo et al. (2009) o valor da concentração máxima no soro (Cmax) da daptomicina corresponde a 95 µg/ml.

#### 3.2.4.2 Efeito da daptomicina sobre as células de *S. epidermidis* em biofilme

##### 3.2.4.2.1 Unidades formadoras de colônia (UFC)

Os resultados do efeito das concentrações avaliadas de daptomicina (CIM e concentração máxima no soro) sobre as células em biofilme de *S. epidermidis* (1457 e 9142) estão apresentados na Figura 27.

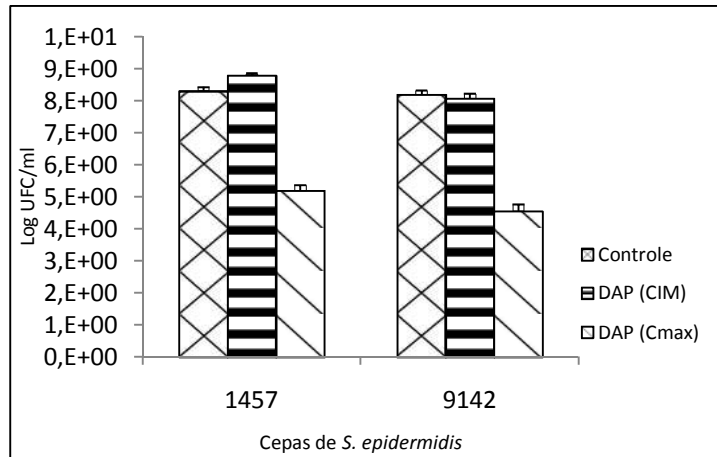


Figura 27 - Efeito da daptomicina (DAP) na concentração CIM e na concentração máxima no soro (Cmax) sobre as células em biofilme de *S. epidermidis*

O resultado do efeito da daptomicina sobre as células de *S. epidermidis* em biofilme apresentados na Figura 27, mostrou que o uso de daptomicina na concentração CIM, não causou nenhum efeito sobre as células de estafilococos em biofilme. No entanto o uso de daptomicina na concentração máxima no soro mostrou uma diminuição significativa em ambas as cepas avaliadas ( $p < 0,05$ ) com cerca de 3-4  $\log_{10}$  UFC/ml.

#### 3.2.4.2.2 Método colorimétrico- XTT

Os resultados da atividade celular de *S. epidermidis* em biofilme estão apresentados na Figura 28.



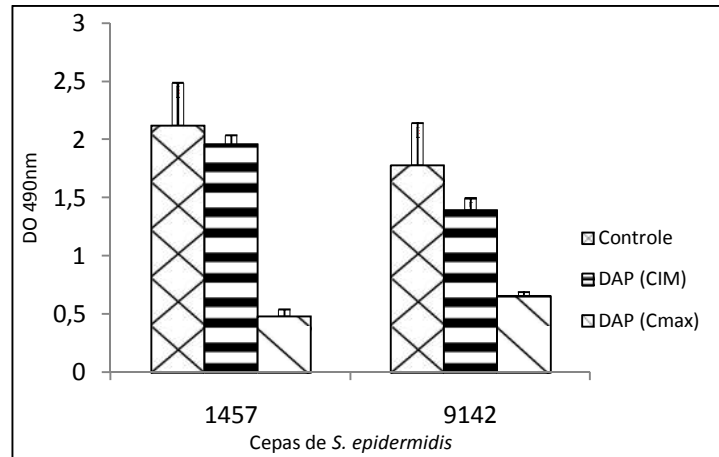


Figura 28 - Atividade celular expressa pelo XTT após tratamento com daptomicina (DAP) na concentração CIM e na concentração sérica máxima (Cmax) sobre células em biofilme de *S. epidermidis*

Os resultados da atividade metabólica das células de *S. epidermidis* (1457 e 9142) em biofilme apresentados na Figura 28, mostrou uma diminuição significativa ( $p < 0,05$ ) da atividade celular nas duas cepas avaliadas quando tratadas com as duas concentrações de daptomicina comparadas com o controle. No entanto a maior diminuição foi observado em ambas as cepas de *S. epidermidis* quando tratadas com daptomicina na concentração máxima no soro.

#### 3.2.4.2.3 Cristal violeta (CV)

Os resultados da biomassa total dos biofilmes de *S. epidermidis* (1457 e 9142) tratados com daptomicina estão apresentados na Figura 29.

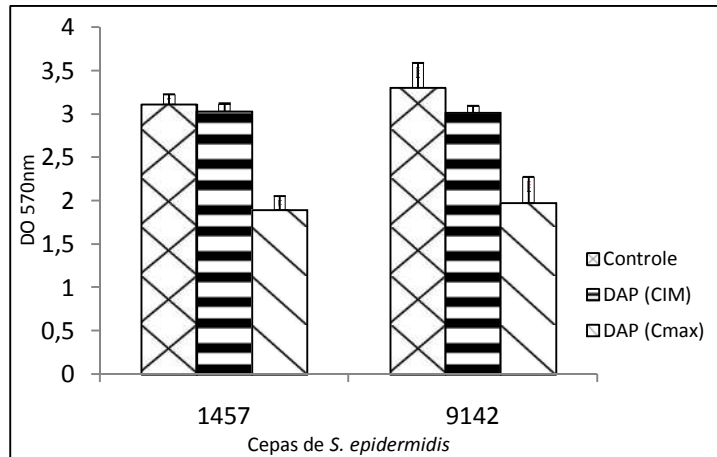


Figura 29 - Biomassa total após tratamento com daptomicina (DAP) na concentração CIM e na concentração máxima no soro (Cmax) sobre células em biofilme de *S. epidermidis*

A Figura 29 mostra o efeito da daptomicina sobre a biomassa das células de *S. epidermidis* (1457 e 9142) e, foi observada diferença significativa ( $p < 0,05$ ) na diminuição da biomassa das duas cepas de *S. epidermidis* quando tratadas com daptomicina na concentração máxima no soro. O uso de daptomicina na concentração CIM mostrou uma pequena diminuição significativa ( $p < 0,05$ ) da biomassa de *S. epidermidis* 1457.

### 3.2.5 Vancomicina

#### 3.2.5.1 Determinação CIM- E-test

A Tabela 8 mostra as concentrações inibitórias mínimas- E-test da vancomicina nas cepas de *S. epidermidis* e *S. aureus*.

O E-test para as células de estafilococos avaliadas, estão ilustrados na Figura 30.

Tabela 8 - E-test da vancomicina nas cepas de estafilococos

Cepa	Número de identificação laboratorial	E-test (CIM)
<i>S. epidermidis</i>	1	3 µg/ml
	127	4 µg/ml
	165	3 µg/ml
	1457	8 µg/ml
	9142	8 µg/ml
<i>S. aureus</i>	2	2 µg/ml
	35	2 µg/ml
	73	1,5 µg/ml
	173	2 µg/ml
	174	2 µg/ml

De acordo com Cerca et al. (2005) o valor da vancomicina na concentração máxima no soro (Cmax) corresponde a 40 µg/ml.

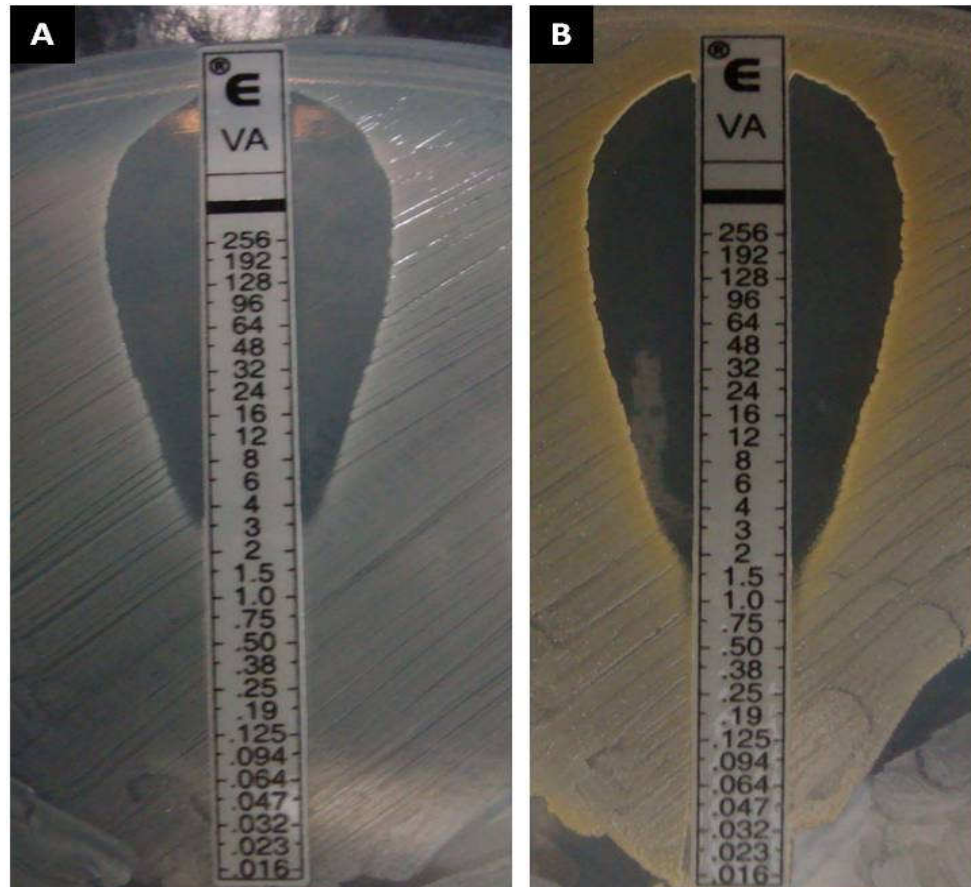


Figura 30 - E-test da vancomicina sobre células de *S. epidermidis* (A) e *S. aureus* (B)

### 3.2.5.2 Efeito da vancomicina sobre as células de estafilococos em biofilme

#### 3.2.5.2.1 Unidades formadoras de colônia (UFC)

Os resultados do efeito das concentrações de vancomicina sobre as células em biofilme de *S. epidermidis* e *S. aureus* estão apresentados respectivamente nas Figuras 31 e 32.

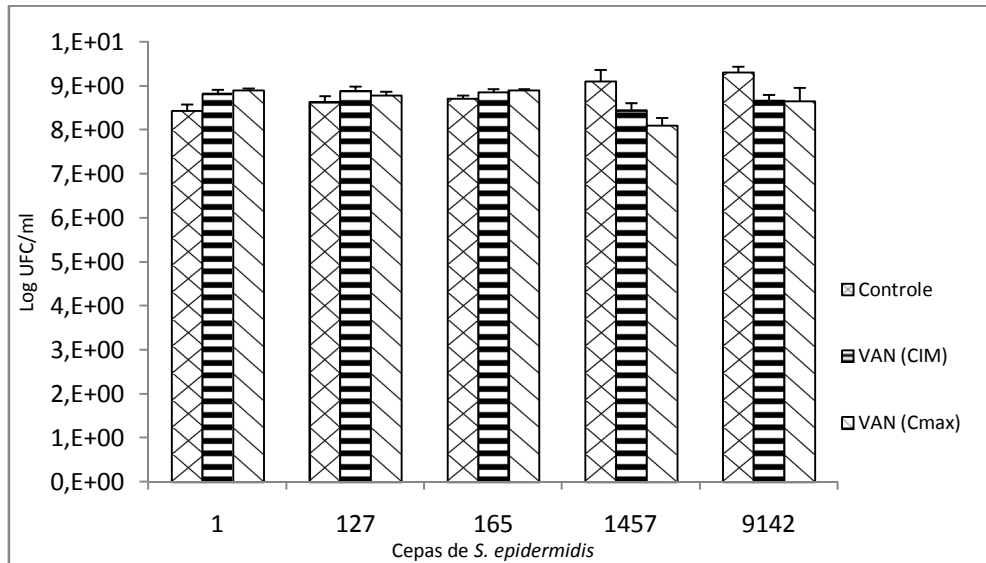


Figura 31 - Efeito da vancomicina (VAN) na concentração CIM e na concentração máxima no soro (Cmax) sobre as células em biofilme de *S. epidermidis*

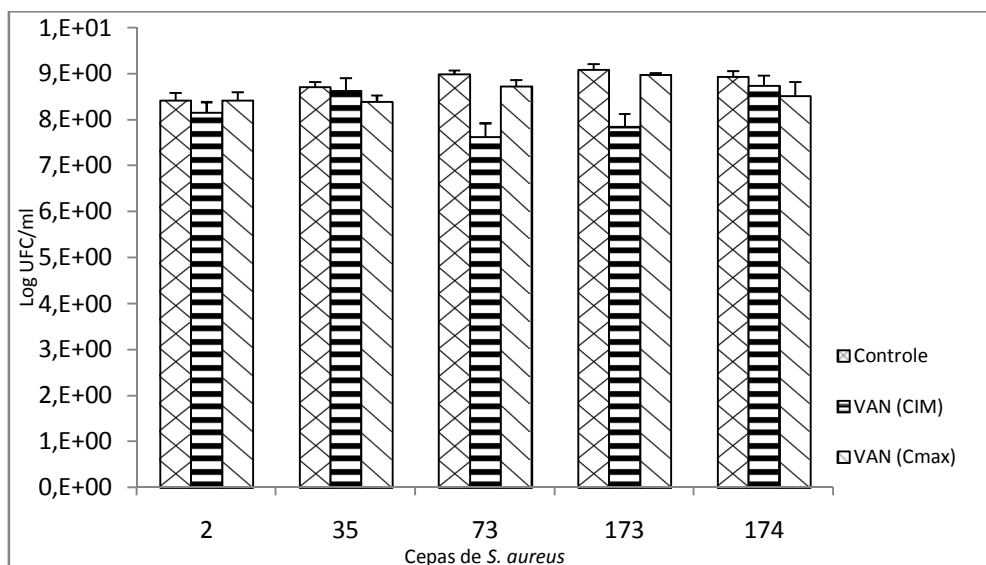


Figura 32 - Efeito da vancomicina (VAN) na concentração CIM e na concentração máxima no soro (Cmax) sobre as células em biofilme de *S. aureus*

O efeito da vancomicina na concentração CIM e na concentração máxima no soro apresentados nas Figuras 31 e 32, mostraram que o uso da vancomicina independente da concentração avaliada não apresentou uma diminuição significativa de células de *S. epidermidis* e *S. aureus*, em todas as cepas avaliadas não houve uma diminuição de células viáveis maior que 1-2 log<sub>10</sub> UFC/ml.

### 3.3 Agentes farmacológicos avaliados em combinação

#### 3.3.1 N-acetilcisteína (NAC) com rifampicina

##### 3.3.1.1 Efeito do NAC com rifampicina sobre as células de *S. epidermidis* em biofilme

###### 3.3.1.1.1 Unidades formadoras de colônia (UFC)

Os resultados do efeito da combinação do NAC (CIM e 10xCIM) com rifampicina (concentração máxima no soro) sobre as células em biofilme de *S. epidermidis* estão apresentados na Figura 33.

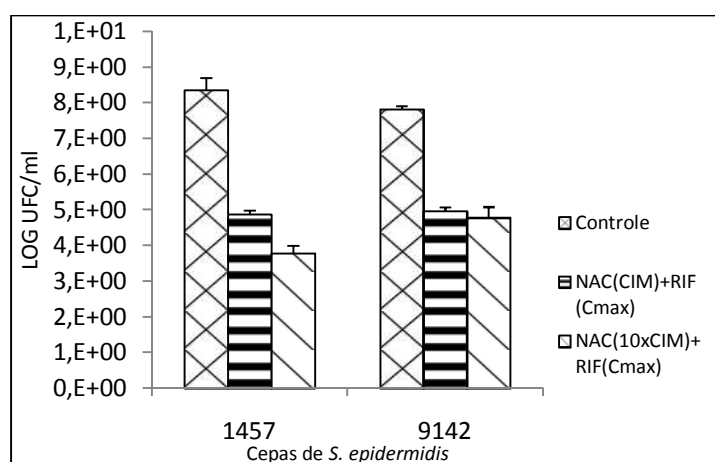


Figura 33 - Efeito do NAC (CIM e 10xCIM) combinado com rifampicina (RIF) na concentração máxima no soro (Cmax) sobre as células em biofilme de *S. epidermidis*

A combinação NAC-rifampicina (Figura 33) sobre as células em biofilme de *S. epidermidis* (1457 e 9142), mostrou uma diminuição significativa ( $p < 0,05$ ) do número de bactérias viáveis de ambos os biofilme avaliados com redução de cerca de 3-4  $\log_{10}$  UFC/ml independentemente da concentração utilizada de NAC.

### 3.3.1.1.2 Método colorimétrico- XTT

Os resultados da atividade celular do NAC combinado com rifampicina sobre as células em biofilme de *S. epidermidis* (1457 e 9142) estão apresentados na Figura 34.

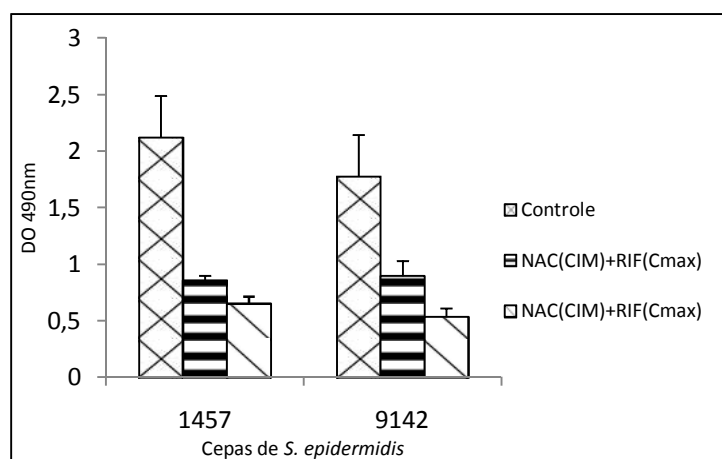


Figura 34 - Atividade celular expressa pelo XTT após tratamento com NAC (CIM e 10xCIM) combinado com rifampicina (RIF) na concentração máxima no soro (Cmax) sobre células em biofilme de *S. epidermidis*

Os resultados de XTT expressam a diminuição da atividade metabólica, após o tratamento com os agentes testados em combinação como mostrados na Figura 34. O uso de NAC com rifampicina independente da concentração utilizada mostrou uma diminuição significativa da atividade das células ( $p < 0,05$ ).

### 3.3.1.1.3 Cristal violeta (CV)

Os resultados da biomassa total dos biofilmes de *S. epidermidis* (1457 e 9142) tratados com NAC combinado com rifampicina estão apresentados na Figura 35.

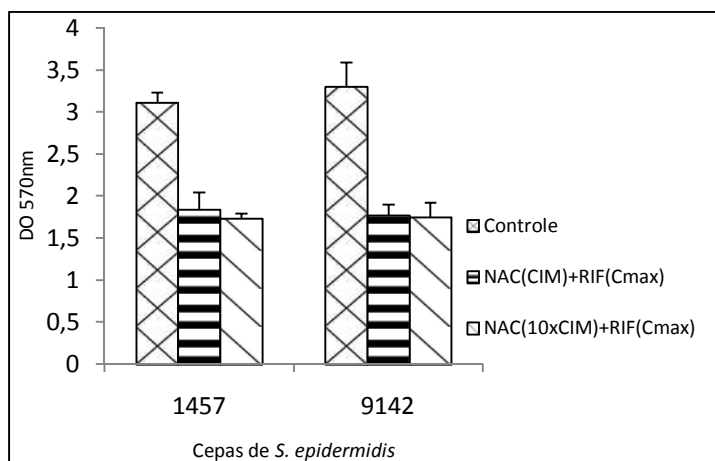


Figura 35 - Biomassa total após tratamento com NAC (CIM e 10xCIM) combinado com rifampicina (RIF) na concentração máxima no soro (Cmax) sobre células em biofilme de *S. epidermidis*

A biomassa total das células em biofilme avaliada pelo método de coloração CV, confirma o efeito dos agentes testados em combinação observados pelas células viáveis e XTT. A Figura 35 mostra uma diminuição significativa ( $p < 0,05$ ) da biomassa das células em biofilme de ambas as cepas avaliadas independente da combinação avaliada.

### 3.3.1.2 Extração da matriz do biofilme

A Figura 36 mostra a quantidade de proteínas e polissacarídeos da matriz dos biofilmes de *S. epidermidis* (1457 e 9142) após tratamento com NAC combinado com rifampicina.



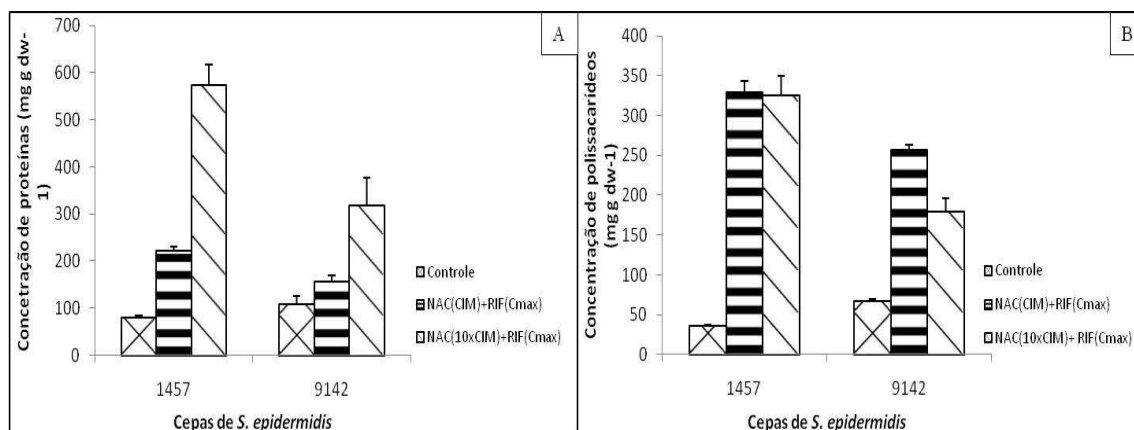


Figura 36 - Quantificação de proteínas (A) e polissacarídeos (B) da matriz dos biofilmes de *S. epidermidis* após tratamento com NAC (CIM e 10xCIM) combinado com rifampicina (RIF) na concentração máxima no soro (Cmax)

A composição da matriz mostrou um aumento geral significativo ( $p < 0,05$ ) na quantidade de proteínas e polissacarídeos após o tratamento da combinação NAC-rifampicina apresentado na Figura 36. A quantidade de proteínas foi muito alta após o tratamento da combinação NAC (10xCIM) com rifampicina ( $p < 0,05$ ). No entanto, a quantidade de polissacarídeos foi alta após o tratamento com NAC-rifampicina, independentemente da concentração de NAC utilizada ( $p < 0,05$ ).

### 3.3.1.3 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

As micrografias eletrônicas de varredura estão apresentadas na Figura 37 e, mostram as células em biofilme de *S. epidermidis* (1457) tratadas com NAC e rifampicina em combinação.

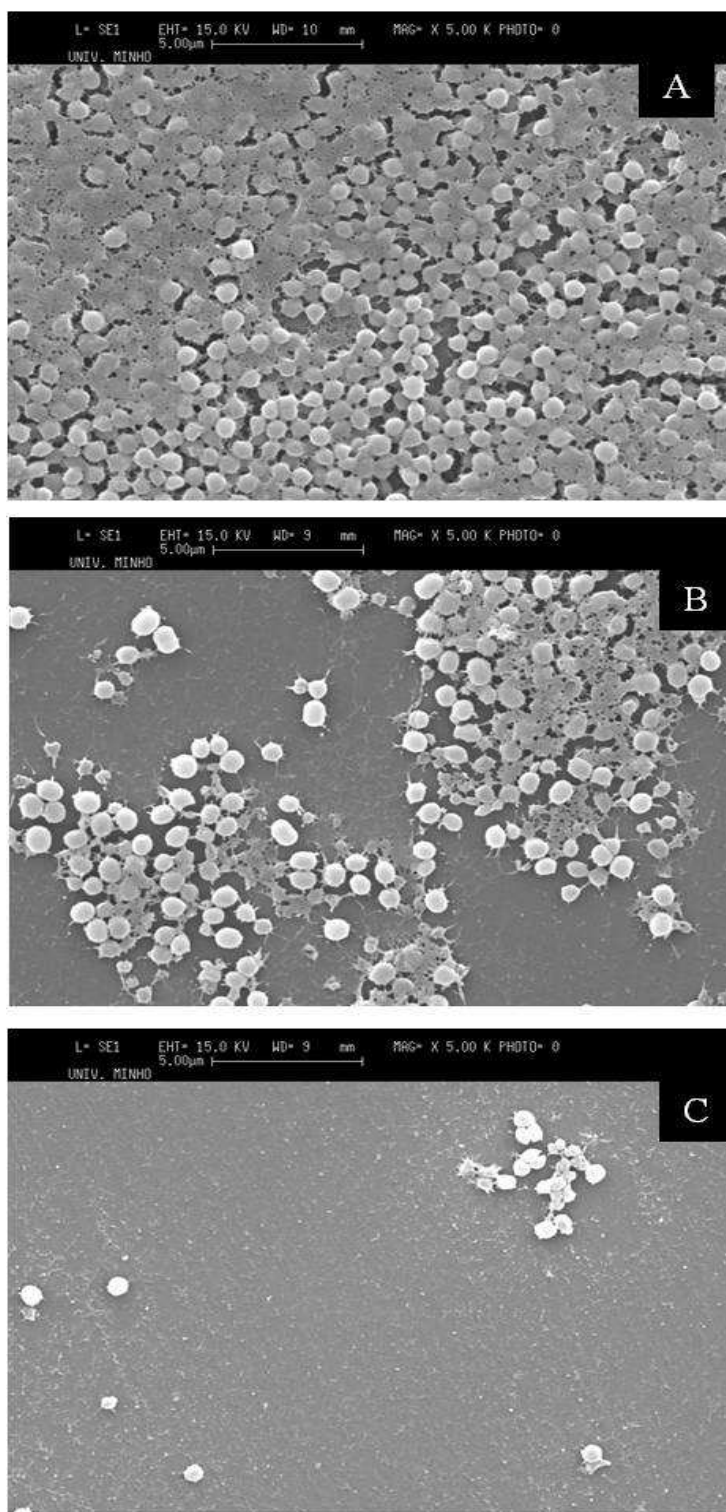


Figura 37 - Micrografias eletrônicas de varreduras (MEV) do biofilme de *S. epidermidis* (1457): Controle positivo (A), após tratamento com NAC (CIM) combinado com rifampicina na concentração máxima no soro (Cmax) (B) e NAC (10xCIM) combinado com rifampicina (Cmax) (C). A barra nas imagens correspondem a 5 µm. (Leica Cambridge S-360)

A MEV mostrou imagens do biofilme de *S. epidermidis* (1457) após tratamento com os agentes avaliados em combinação. Como pode ser observado na Figura 37-C, após tratamento com NAC (10xCIM) em combinação com rifampicina na concentração máxima no soro, a quantidade de matriz é muito pequena e pode-se observar uma diminuição significativa de células comparada ao controle (Figura 37-A).

### 3.3.1.4 Efeito do NAC com rifampicina sobre as células planctônicas de *S. epidermidis*

#### 3.3.1.4.1 Unidades formadoras de colônia (UFC)

Os resultados do efeito das concentrações de NAC combinado com rifampicina sobre as células planctônicas de *S. epidermidis* (1457 e 9142 e) estão apresentados na Figura 38.

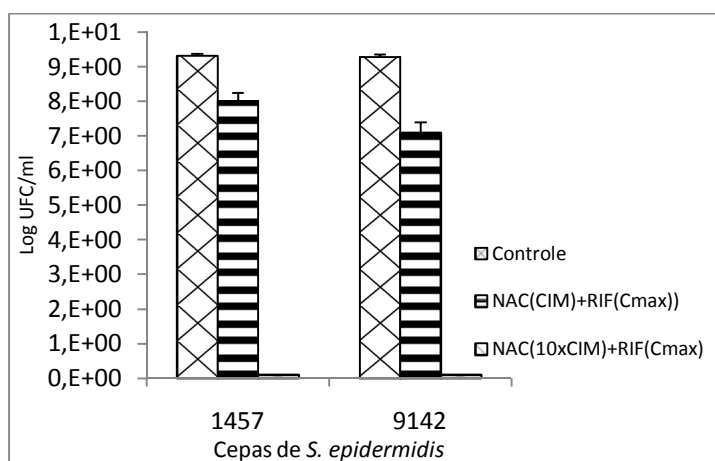


Figura 38 - Efeito do NAC (CIM e 10xCIM) combinado com rifampicina (RIF) na concentração máxima no soro (Cmax) sobre as células planctônicas de *S. epidermidis*

A Figura 38 apresenta o número de células viáveis das duas cepas de *S. epidermidis* (9142 e 1457) após o tratamento com agentes antimicrobianos em combinação. O uso de NAC (CIM) com rifampicina mostrou uma diminuição significativa ( $p < 0,05$ ) com redução de

cerca de  $2 \log_{10}$  UFC/ml. No entanto, a combinação de NAC (10xCIM) com rifampicina promoveu um efeito letal ( $p < 0,05$ ) sobre as células planctônicas.

### 3.3.1.4.2 Método colorimétrico- XTT

Os resultados da atividade celular da combinação NAC-rifampicina sobre as células planctônicas de *S. epidermidis* estão apresentados na Figura 39.

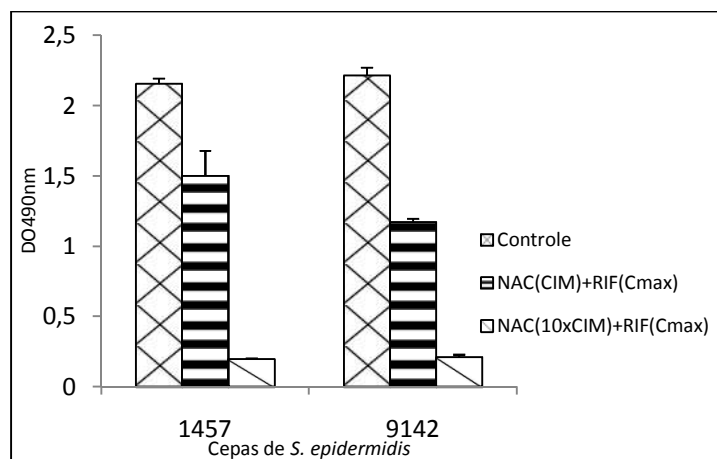


Figura 39 - Atividade celular expressa pelo XTT após tratamento com NAC (CIM e 10xCIM) combinado com rifampicina (RIF) na concentração máxima no soro (Cmax) sobre células planctônicas de *S. epidermidis*

Os resultados da atividade metabólica das células planctônicas apresentados na Figura 39 mostraram uma diminuição significativa ( $p < 0,05$ ) da atividade celular independente da concentração de NAC utilizada combinada com rifampicina. Os resultados estão em concordância com os obtidos por unidades formadoras de colônia (UFC).

### 3.3.2 N-acetilcisteína (NAC) com linezolida

#### 3.3.2.1 Efeito do NAC com linezolida sobre as células de *S. epidermidis* em biofilme

##### 3.3.2.1.1 Unidades formadoras de colônia (UFC)

Os resultados do efeito da combinação de NAC (CIM e 10xCIM) com linezolida (CIM e concentração máxima no soro) sobre as células em biofilme de *S. epidermidis* estão apresentados na Figura 40.

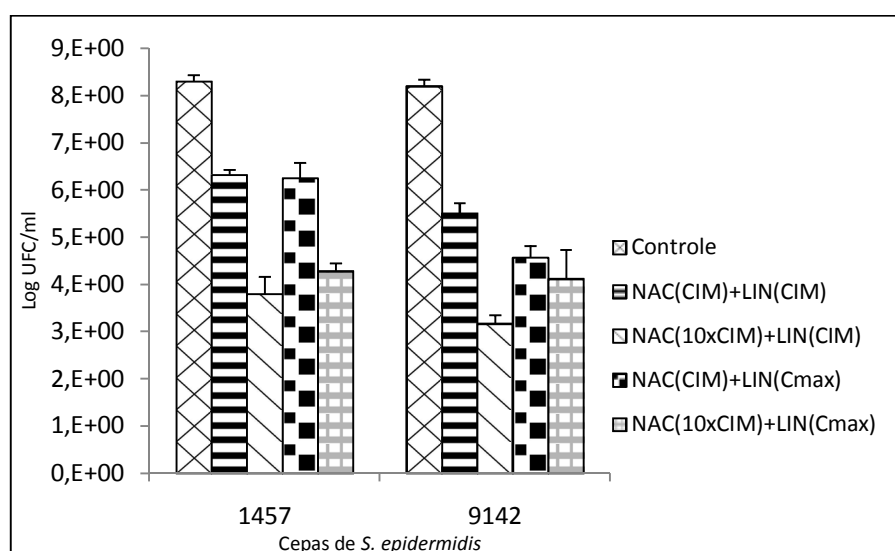


Figura 40 - Efeito do NAC em combinação com linezolida (LIN) nas concentrações CIM, 10xCIM e na concentração máxima no soro (Cmax) sobre as células em biofilme de *S. epidermidis*

Os resultados das células viáveis do biofilme de *S. epidermidis* (1457 e 9142) após o tratamento com NAC combinado com linezolida apresentados na Figura 40, mostrou que o uso combinado de NAC-LIN independente da concentração avaliada mostrou uma diminuição significativa ( $p < 0,05$ ) nas células viáveis. O maior efeito sobre as células viáveis foi observado pela combinação do NAC (10xCIM) com linezolida (CIM), promoveu uma redução de cerca de 4-5  $\log_{10}$ .

### 3.3.2.1.2 Método colorimétrico- XTT

Os resultados da atividade celular do NAC combinado com linezolida sobre as células em biofilme de *S. epidermidis* (1457 e 9142 e) estão apresentados na Figura 41.

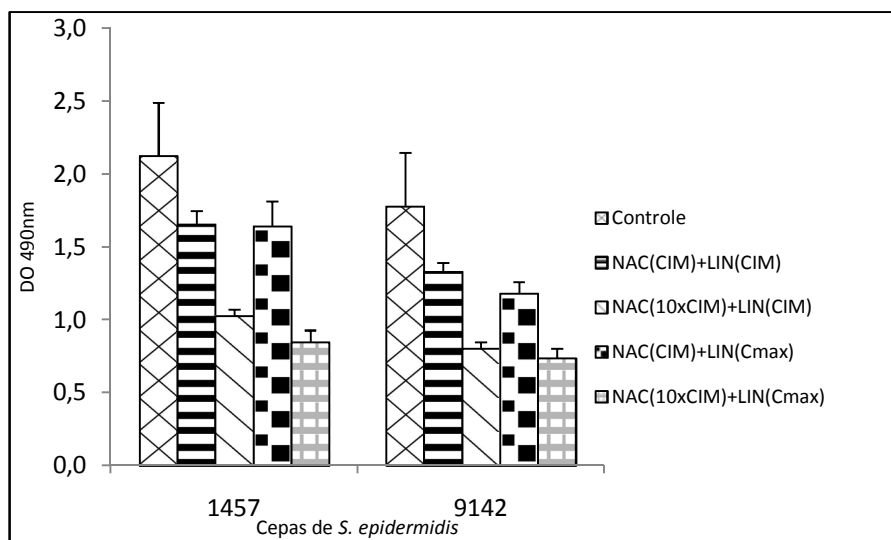


Figura 41 - Atividade celular expressa pelo XTT após tratamento com NAC em combinação com linezolida (LIN) nas concentrações CIM, 10xCIM e concentração máxima no soro (Cmax) sobre as células em biofilme de *S. epidermidis*

Os resultados apresentados na Figura 41 expressam a diminuição da atividade metabólica, medida pelo ensaio de redução XTT após o tratamento de NAC e linezolida combinados. O uso dos agentes farmacológicos avaliados em combinação, mostraram efeito significativo com todas as concentrações avaliadas, no entanto, o uso de NAC (10xCIM) com linezolida independente da concentração avaliada mostraram o melhor efeito significativo ( $p < 0,05$ ) sobre a atividade das células em biofilme de *S. epidermidis* para ambas as cepas avaliadas.

### 3.3.2.1.3 Cristal violeta (CV)

Os resultados da biomassa total dos biofilmes de *S. epidermidis* (1457 e 9142) tratados com NAC combinado com linezolida estão apresentados na Figura 42.

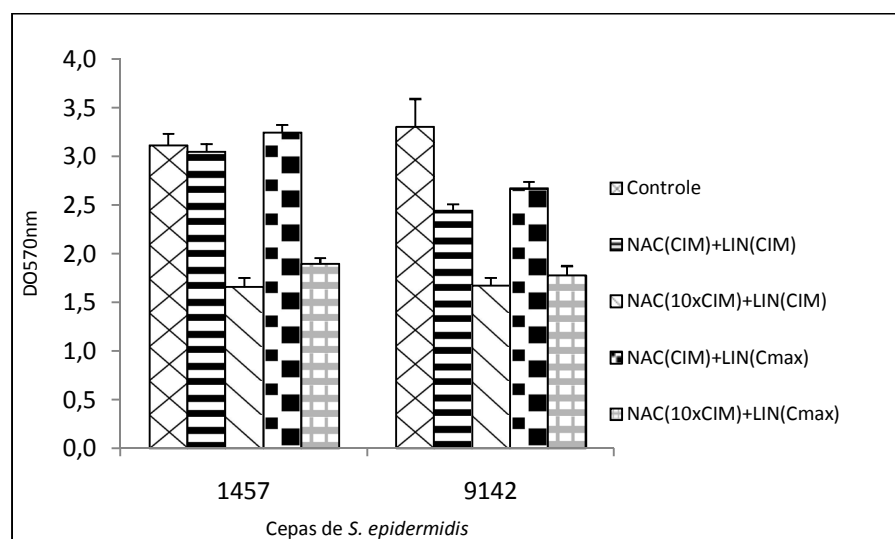


Figura 42 - Biomassa total após tratamento com NAC em combinação com linezolida (LIN) nas concentrações CIM, 10xCIM e na concentração máxima no soro (Cmax) sobre as células em biofilme de *S. epidermidis*

A biomassa total do biofilme apresentados na Figura 42 estão em boa concordância com os resultados obtidos pelo método colorimétrico XTT.

### 3.3.3 N-acetilcisteína (NAC) com vancomicina

#### 3.3.3.1 Efeito do NAC com vancomicina sobre as células de estafilococos em biofilme

##### 3.3.3.1.1 Unidades formadoras de colônia (UFC)

Os resultados do efeito da combinação do NAC (CIM e 10xCIM) com vancomicina (CIM e concentração máxima no soro) sobre as células em biofilme de *S. epidermidis* e *S. aureus* estão apresentados respectivamente nas Figuras 43 e 44.

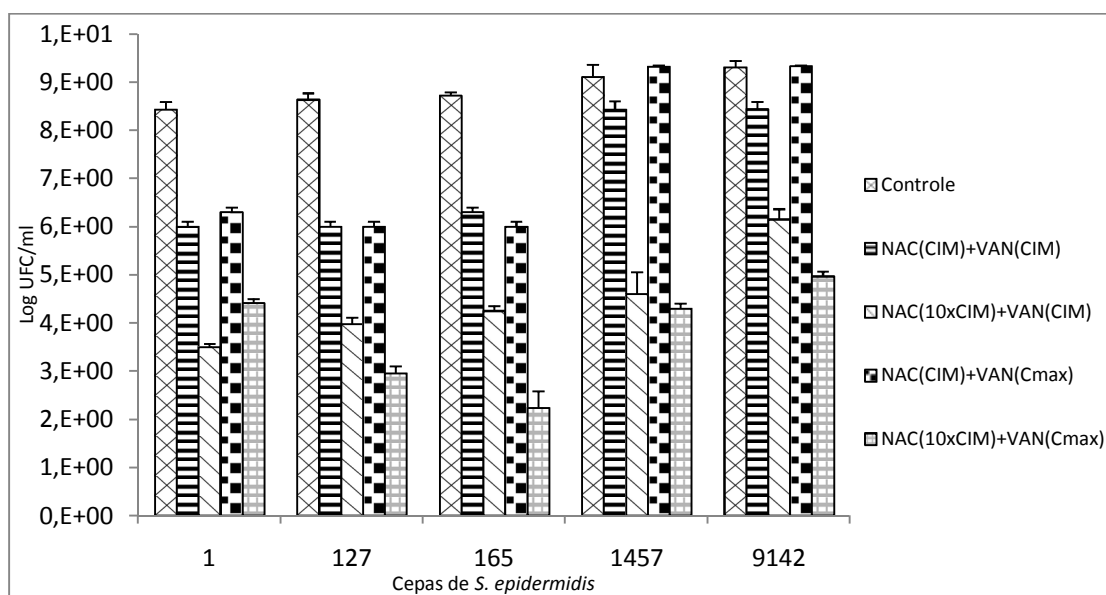


Figura 43 - Efeito do NAC combinado com vancomicina (VAN) nas concentrações CIM, 10xCIM e concentração máxima no soro (Cmax) sobre as células em biofilme de *S. epidermidis*



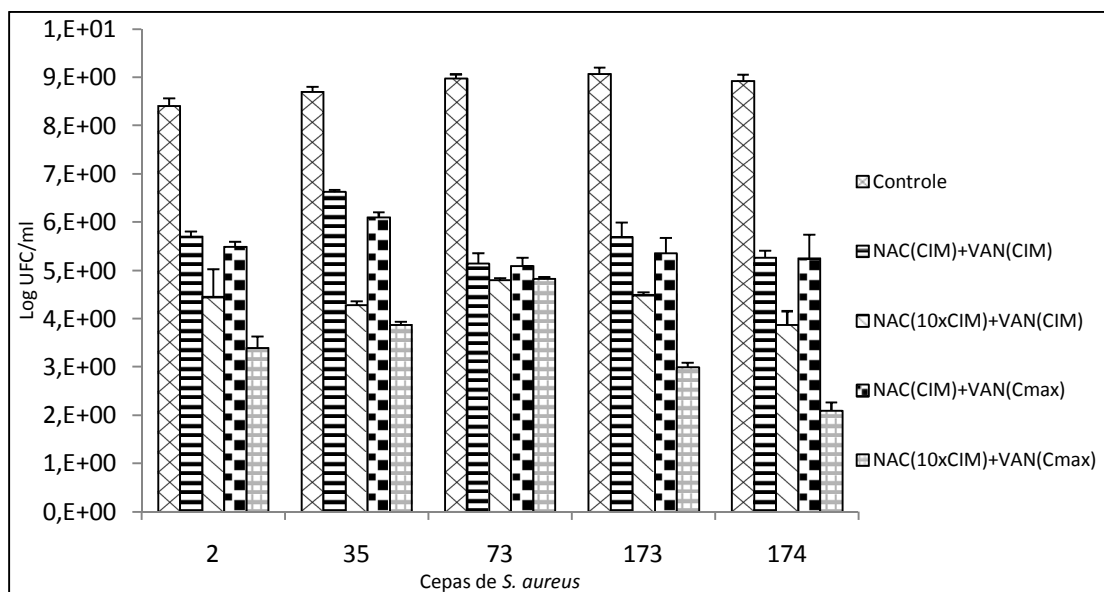


Figura 44 - Efeito do NAC combinado com vancomicina (VAN) nas concentrações CIM, 10xCIM e concentração máxima no soro (Cmax) sobre as células em biofilme de *S. aureus*

As Figuras 43-44 mostram o efeito do NAC (CIM e 10xCIM) combinado com vancomicina (CIM e Cmax) sobre as células de estafilococos em biofilme.

Para todas as cepas de *S. epidermidis* (Figura 43) foi observado uma diminuição significativa ( $p < 0,05$ ) das células viáveis quando tratadas com NAC 10xCIM combinado com vancomicina independente da concentração avaliada, com uma diminuição de células com cerca de 5-6  $\log_{10}$  UFC/ml. A combinação NAC (CIM) com vancomicina (Cmax) não mostrou uma diminuição significativa de células viáveis para as cepas de *S. epidermidis* 9142 e 1457, mostraram maior resistência para esta combinação, no entanto, para as demais cepas (1, 127 e 165) mostraram uma diminuição significativa ( $p < 0,05$ ) com cerca de 2  $\log_{10}$  UFC/ml.

A diminuição de células viáveis de *S. aureus* (Figura 44) apresentou um melhor efeito quando tratadas com NAC (10xCIM) combinado com vancomicina na concentração máxima no soro (Cmax), mostrou uma diminuição para todas as cepas de *S. aureus* avaliadas com cerca de 5-6  $\log_{10}$  UFC/ml ( $p < 0,05$ ). As demais concentrações avaliadas mostraram um efeito significativo ( $p < 0,05$ ) sobre as células viáveis de *S. aureus* comparadas com o controle, sendo observada uma diminuição de aproximadamente 3-4  $\log_{10}$  UFC/ml.

# **Capítulo IV**

## **Discussão e Conclusão**

## 4. Discussão e Conclusão

### 4.1 Discussão

As células bacterianas têm crescido no fenótipo de biofilme por bilhões de anos, o que as torna resistentes aos agentes farmacológicos e as células do sistema imune mobilizados pelo hospedeiro. As substâncias poliméricas extracelulares que constituem a matriz do biofilme apresentam uma barreira para a ação destes agentes (DONLAN; COSTERTON, 2002; PRESTERL et al., 2009 ).

Esta situação tem nos impulsionado a buscar novas estratégias terapêuticas que sejam capazes de evitar a resistência das células em biofilme aos agentes farmacológicos.

Deste modo, no presente estudo, foi avaliado a ação do N-acetilcisteína (NAC) contra as células em biofilme de *S. epidermidis* (Figura 11) e *S. aureus* (Figura 12). O uso de NAC 10xCIM mostrou uma diminuição significativa de células viáveis (4-5 log<sub>10</sub> UFC/ml) para todas as cepas avaliadas. Estudos anteriores mostraram que o NAC diminuiu as células em biofilme por uma variedade de bactérias, tais como *Escherichia coli*, *S. epidermidis* e *Pseudomonas aeruginosa* e, observaram uma redução na formação da matriz extracelular dos biofilmes. Os autores concluíram que o NAC apresenta propriedades anti-bacterianas com a capacidade de reduzir as células em biofilme e o polissacarídeo extracelular (PEREZ-GIRALDO et al., 1997; MARCHESE et al., 2003; SCHWANDT et al., 2004; ZHAO; LIU, 2010).

O uso do NAC 10xCIM sobre as células planctônicas (Figura 18), foi bactericida para as células de *S. epidermidis* avaliadas. Nossos resultados estão de acordo com os resultados de Olofsson, Hermansson e Elwing (2003), que relataram o efeito do NAC na capacidade de reduzir o crescimento bacteriano das células planctônicas de bactérias gram-positivas

(*Bacillus* sp., *B. cereus*, *B. megaterium*, *B. subtilis*, *Staphylococcus warneri*) e gram-negativas (*Acinetobacter baumannii*, *A. lwoffii*, *Enterobacter cloacae*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas mendocina*).

O NAC é conhecido por atuar na redução de polissacarídeo extracelular do biofilme (PEREZ-GIRALDO et al., 1997). Nossos resultados estão de acordo com o efeito relatado por outros autores do NAC. No presente estudo, avaliou-se a composição da matriz extracelular (Figura 16) e, mostrou um aumento significativo na quantidade de proteínas e polissacarídeos após o tratamento das células em biofilme de *S. epidermidis* com NAC 10xCIM. Notoriamente, a quantidade de proteínas foi muito elevada após tratamento, o que é consistente de um maior grau de lise celular. O aumento de polissacarídeos é provavelmente devido a ação do NAC na estrutura da matriz e, assim tornando a sua extração mais eficaz. As micrografias eletrônicas de varredura confirmaram o efeito relatado do NAC 10xCIM sobre as células em biofilme de estafilococos (Figura 17).

O NAC apresentou grande eficácia contra as células planctônicas e as células em biofilme de estafilococos, nestas diminuindo as células viáveis e reduzindo a quantidade de matriz extracelular. Ou seja, o uso de NAC é uma opção terapêutica para tratamento de infecções por estafilococos e ainda potencializa a ação de outros antibióticos contra as células em biofilme.

Conforme descrito por vários autores, a rifampicina apresenta alta eficácia contra biofilmes de *S. epidermidis*, quando comparada com outros antibióticos comuns (SVENSSON, 1997a, 1997b; MONZON et al., 2001; CERCA et al., 2005). Nesse estudo, como se poderia esperar de estudos anteriores, a rifampicina sozinha mostrou grande eficácia contra as células em biofilme de *S. epidermidis* (Figura 20), com redução significativa (aproximadamente 3 log<sub>10</sub> UFC/ml) de células viáveis quando avaliado na concentração

máxima no soro (10 mg/l). Também foi observado redução da atividade celular (Figura 21) e diminuição da biomassa total do biofilme (Figura 22).

Na década passada, dois agentes antibacterianos linezolida e daptomicina foram aprovados e propuseram novas opções para o tratamento, por exemplo, de infecções complicadas da pele causada por bactérias gram-positivas resistentes (STUBBINGS; LABISCHINSKI, 2009). Estes fatos desencadearam nossos interesses na possibilidade da utilização destes dois novos antibióticos no tratamento de infecções relacionadas com os biofilmes de estafilococos. Deste modo, o uso dos agentes antimicrobianos (linezolida e daptomicina) foram avaliados sozinhos contra os biofilmes de *S. epidermidis*, considerando o potencial uso destes agentes antimicrobianos como possíveis alternativas aos antibióticos comumente utilizados nas infecções causadas por biofilmes de estafilococos. As reduções das células viáveis em biofilme após 24 h de tratamento com o linezolida (Figura 24) e daptomicina (Figura 27) na concentração CIM, não produziu efeito significativo sobre as cepas de *S. epidermidis* avaliadas para ambos os antibióticos. Nossos resultados estão de acordo com a definição por Tetz, G., Artemenko e Tetz, V. (2009), antibióticos nas concentrações CIM não causam nenhum efeito sobre as bactérias em biofilme.

As concentrações CIM de agentes antimicrobianos em condições planctônicas são dramaticamente aumentadas até concentrações de 1.000 vezes os valores de CIM quando avaliados para células em biofilmes (CERI et al., 1999; PRESTERL et al., 2009 ). Levando isso em consideração, e com o objetivo de testar concentrações superiores a CIM, determinou-se a susceptibilidade das células em biofilme nas concentrações máximas no soro, uma vez que tal concentração é o mais alto nível do antibiótico que pode ser obtido no sangue. Neste caso, a daptomicina apresentou efeito significativo sobre as células em biofilme de *S. epidermidis* com redução de cerca de 3-4 log<sub>10</sub> UFC/ml, enquanto que o efeito do linezolida foi ligeiramente menor, mas não atingiu o limiar de 3 log<sub>10</sub> UFC/ml.

Nos estudos de Laplante e Mermel (2007) mostraram o efeito da daptomicina no tratamento de infecção relacionada ao cateter e, observaram que concentrações altas de daptomicina eram capaz de erradicar células de *S. aureus* em biofilme, enquanto que concentrações abaixo de 5 mg/ml não causaram nenhum efeito sobre as células em biofilme.

O efeito do linezolida (Figura 26) e da daptomicina (Figura 29) sobre a biomassa total dos biofilmes de *S. epidermidis*, nas concentrações máximas no soro, foram capazes de reduzir significativamente a biomassa total do biofilme. O linezolida apresentou a maior redução sobre a biomassa total do biofilme, embora não muito mais elevado do que a daptomicina. Esta redução ligeiramente mais elevada na biomassa total do biofilme promovida por linezolida espera-se, que seja devido a uma diminuição na matriz extracelular, tendo em conta que era o agente antimicrobiano que reduziu o número de células viáveis numa menor extensão. A possível redução causada na matriz extracelular por linezolida pode ser uma vantagem potencial, uma vez que a estrutura do biofilme tornar-se mais fraca, e as células presentes no biofilme podem ser mais susceptíveis ao sistema imune e a ação de outros agentes antimicrobianos. Por conseguinte, este mecanismo de ação pode potencializar o efeito de outros agentes antimicrobianos, promovendo interações sinérgicas.

A daptomicina em comparação com a rifampicina na concentração máxima no soro apresentaram um efeito muito semelhante sobre as células em biofilme de *S. epidermidis*. No entanto, tendo em consideração o rápido aparecimento de resistência à rifampicina, quando utilizado como monoterapia, o uso de daptomicina é mais aplicável para o tratamento de infecções relacionadas por biofilmes de estafilococos quando utilizados sozinhos. Esta opinião está de acordo com o estudo de Raad et al. (2007), que avaliaram a exposição de agentes antimicrobianos por 5 dias contra biofilmes de *S. aureus*. Mostraram que a daptomicina foi o agente mais rápido para eliminar as células em biofilme, enquanto, que o uso de rifampicina sozinha, foi o antibiótico menos eficaz na erradicação de células de *S.*

*aureus* em biofilme, uma vez que foi associado com o aparecimento de resistência a rifampicina. No entanto, quando eles avaliaram a rifampicina em combinação com outros antibióticos, a combinação foi significativamente eficaz em eliminar as células em biofilme mais rapidamente do que cada um dos outros antibióticos avaliados sozinho (daptomicina, tigeciclina, linezolida, vancomicina e minociclina).

Os resultados obtidos nos levaram a sugerir que a daptomicina na concentração máxima no soro pode ser fortemente considerado como uma alternativa potencial à rifampicina na monoterapia. Embora, a rifampicina, também demonstrou ser altamente ativo contra os biofilmes de *S. epidermidis*, só deve ser considerada para uma atividade anti-estafilocócica em combinação com outros antibióticos, para evitar o rápido aparecimento de resistência.

Neste estudo, a vancomicina também foi avaliada sozinha contra biofilmes de *S. epidermidis* e *S. aureus*, por sua conhecida capacidade de penetrar em biofilmes e efetivamente reduzir o número de células bacterianas viáveis (DUNNE; MASON; KAPLAN, 1993; WILCOX et al., 2001). No entanto, em nossos resultados a utilização de vancomicina sozinha sobre as células de estafilococos em biofilme (Figura 31-32) não mostrou nenhum efeito significativo sobre as células viáveis. Nossos resultados estão de acordo com os resultados de Bayston, Ullas e Ashraf (2012) relataram o efeito da vancomicina contra biofilmes de enterococos e, observaram que o antibiótico não foi capaz de erradicar as células em biofilme. E, contrário aos estudos de Domínguez-Herrera et al. (2012) que estudaram o uso de daptomicina e vancomicina sozinhos contra biofilmes de *S. epidermidis*, e mostraram que o uso de daptomicina diminuiu de maneira significativa as células em biofilme comparado com o efeito ineficaz de vancomicina para diminuição das células em biofilme de *S. epidermidis*.

Atualmente uma combinação de agentes antimicrobianos é uma estratégia para evitar o desenvolvimento de resistência bacteriana (MOELLERING, 2008) e, reduzir o crescimento

das células bacterianas em biofilme de forma significativa (SAGINUR et al., 2006; RAAD et al., 2007). Assim, o presente estudo também avaliou o efeito de agentes farmacológicos em combinação contra células em biofilme e células planctônicas. Conforme a grande eficácia do NAC sozinho contra as células em biofilme dos estafilococos avaliados neste estudo, avaliamos os efeitos combinados do NAC com agentes antimicrobianos.

Devido os diferentes modos de ação do NAC e da rifampicina e, os seus efeitos conhecidos sozinhos, a hipótese é de que a combinação entre eles poderiam apresentar um efeito sinérgico. No entanto, em oposição a nossa hipótese a combinação NAC-rifampicina não apresentou um efeito sinérgico ou aditivo no controle dos biofilmes de *S. epidermidis*. Aslam et al. (2007), relataram em seu estudo um efeito sinérgico de NAC em combinação com tigeciclina em biofilmes de *S. epidermidis* usando NAC 20xCIM (80 mg/ml) com tigeciclina 1000xCIM (1 mg/ml). No entanto, os resultados de Aslam et al. (2007) na redução de células viáveis eram menor do que 3 log<sub>10</sub> UFC/ml. Em relação à combinação NAC (CIM ou 10xCIM) com rifampicina (CIM ou concentração máxima no soro (aproximadamente 100xCIM)) avaliados nesse estudo, os valores obtidos na redução de células viáveis em biofilme foram superiores com uma redução de 3-4 log UFC/mL, correspondendo a uma ação significativa (Figura 33), mesmo que não corresponda a uma sinergia entre os dois agentes. Sobre as células planctônicas, o efeito da combinação NAC (10xCIM) com rifampicina na concentração máxima no soro promoveram um efeito letal sobre as células.

O NAC é uma molécula conhecida em diminuir a quantidade de matriz extracelular do biofilme (OLOFSSON; HERMANSSON; ELWING, 2003) e, a rifampicina conhecida por ser eficaz contra bactérias gram-positivas (DAVIES; YEW, 2003; MITCHISON, 2005). As observações de MEV apoiam esta hipótese, como é observado na Figura 47 uma diminuição da matriz extracelular e redução de células viáveis.



Mick et al. (2010), descreveram que não é aconselhável a utilização de rifampicina como um único agente para o tratamento de infecções, devido a rápida seleção de mutantes resistentes. Nos estudos de Zheng e Stewart (2002) detectaram mutantes resistentes à rifampicina, quando os biofilmes foram expostos ao tratamento com rifampicina sozinha por períodos acima de 48 h.

Nos nossos resultados, a combinação do NAC (independente da concentração usada) com rifampicina (10 mg/l) mostraram um efeito significativo sobre as células em biofilme, o que provavelmente se abre um caminho para uma ação eficaz dos agentes usados em combinação, prevenindo a seleção de mutantes resistentes ao tratamento.

Conforme os efeitos descritos nesse trabalho pelo linezolida (sozinho) na biomassa total dos biofilmes, avaliamos o efeito combinado do NAC com o linezolida. Foi observado um efeito sinérgico entre os agentes avaliados em combinação. O uso de NAC 10xCIM com linezolida (CIM) mostrou uma redução significativa de células viáveis ( $4-5 \log_{10}$  UFC/ml) (Figura 40), diminuição da atividade metabólica das células (Figura 41) e, da biomassa total do biofilme (Figura 42), lembrando que a ação de linezolida sozinho sobre as células em biofilme não apresenta efeito significativo. Nossos resultados estão de acordo com Parra et al. (2012) que relataram o efeito do linezolida sozinho e combinado com daptomicina sobre biofilmes de *S. aureus* e, mostraram que o uso de linezolida sozinho não foi eficaz contra as células em biofilme.

Os resultados mostraram o efeito significativo de NAC em combinação com linezolida, um efeito sinérgico entre os agentes testados. Esta combinação sugere uma utilização potencial na infecção causada por biofilmes de *S. epidermidis*.

A combinação NAC-vancomicina também foi avaliada nesse estudo e, houve grande eficácia desta combinação sobre a redução de células viáveis por todas as cepas de estafilococos avaliadas. Outros autores (GOMES et al., 2011), ao estudar a combinação de

farnesol com vancomicina sobre biofilmes de *S. epidermidis* (1457 e 9142), têm relatado o oposto, que a combinação farnesol-vancomicina não teve um efeito significativo sobre a redução das células em biofilme.

A grande eficácia da combinação NAC-vancomicina foi mostrado nas células do biofilme de *S. epidermidis* (Figura 43) e nas células em biofilme de *S. aureus* (Figura 44) utilizando NAC 10xCIM com vancomicina independente da concentração utilizada (CIM ou concentração máxima no soro), mostrou uma redução de cerca de 5-6  $\log_{10}$  UFC/mL. Acredita-se, que o NAC diminuiu a matriz extracelular dos biofilmes potencializando os efeitos da vancomicina, que sozinha não teve efeito significativo sobre as células em biofilme. Nossos resultados estão de acordo com os estudos de Presterl et al. (2009) onde, biofilmes de *S. epidermidis* foram tratados com vancomicina sozinha e em combinação com azitromicina e, observaram que o uso de vancomicina como único agente não reduziu o crescimento bacteriano, no entanto, o uso combinado de vancomicina provocou uma redução significativa das células em biofilme.

Os resultados indicam que esta combinação NAC-vancomicina representa uma possível estratégia terapêutica para as infecções causadas por biofilmes de estafilococos.

## 4.2 Conclusão

O principal objetivo desta tese foi avaliar agentes farmacológicos contra biofilmes de *Staphylococcus epidermidis* e *S. aureus*, afim de se alcançar uma nova estratégia terapêutica contras as infecções ocasionadas por biofilmes de estafilococos. Para se alcançar este objetivo, foram avaliados vários agentes farmacológicos com diferentes modos de ação.

Dentre os agentes farmacológicos avaliados sozinhos, o N-acetilcisteína apresentou um maior efeito sobre as células em biofilme, seguido por daptomicina e, posteriormente um efeito similar entre rifampicina e linezolida e por fim o uso sozinho de vancomicina não apresentou efeito significativo sobre as células em biofilme.

O N-acetilcisteína sozinho apresentou grande eficácia contra as células em biofilme e células planctônicas e, posteriormente, um melhor efeito foi observado quando combinado aos agentes antimicrobianos, respectivamente com vancomicina, linezolida e rifampicina. Uma possível explicação para este efeito aumentado, pode ser devido à degradação da matriz extracelular do biofilme ocasionado por NAC, fazendo com que as células do biofilme estivessem mais susceptível à ação dos antibióticos.

No geral, os resultados indicam um efeito potencial do NAC sozinho ou combinado, contra as células em biofilme de estafilococos, com perda de viabilidade celular e, conseqüentemente diminuição da biomassa total e diminuição de atividade celular. A redução causada na matriz extracelular pelo NAC pode ser uma vantagem potencial, uma vez que a estrutura do biofilme tornar-se mais fraca, e as células presentes no biofilme podem ser mais susceptíveis ao sistema imune e a ação de outros agentes antimicrobianos. Indicando como nova opção terapêutica contra as infecções causadas por biofilme de estafilococos.

Em conclusão, os resultados apresentados nesta tese podem ser fortemente considerados como estratégias terapêuticas para um eficiente controle das infecções causadas por biofilmes de *S. epidermidis* e *S. aureus*. Além disso, as combinações podem ser uma alternativa para a monoterapia, evitando o desenvolvimento de resistência.

# **Capítulo V**

## **Referências Bibliográficas**

## 5. Referências Bibliográficas

AARON, S.D. et al. Single and combination antibiotic susceptibilities of planktonic, adherent, and biofilm-grown *Pseudomonas aeruginosa* isolates cultured from sputa of adults with cystic fibrosis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 40, p. 4172 - 4179, 2002.

ABOSHKIWA, M.; ROWLAND, G.; COLEMAN, G. Nucleotide sequence of the *Staphylococcus aureus* RNA polymerase *rpoB* gene and comparison of its predicted amino acid sequence with those of other bacteria. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1262, p. 73 - 78, 1995.

ABRAHAM, E.P.; CHAIN, E. An Enzyme from Bacteria able to Destroy Penicillin. **Nature**, v. 46, p. 837-837 1940.

AHLSTRAND, E. et al. Glycopeptide resistance in coagulase-negative staphylococci isolated in blood cultures from patients with hematological malignancies during three decades. **European Journal Clinical Microbiology Infectious Diseases**, v. 30, p. 1349-1354, 2011.

AMORENA, B. et al. Antibiotic susceptibility assay for *Staphylococcus aureus* in biofilms developed in vitro. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 44, p. 43-55, 1999.

AMSTERDAM, D. Susceptibility testing of antimicrobials in liquid media. In: **Antibiotics in Laboratory Medicine**, v. 53, p.105, 1991.

ANDES, D. et al. Application of pharmacokinetics and pharmacodynamics to antimicrobial therapy of respiratory tract infections. **Clinics in laboratory medicine**, v. 24, p. 477-502, 2004.

ARCIOLA, C.R.; BALDASSARRI, L.; MONTANARO, L. Presence of *icaA* and *icaD* genes and *slime* production in a collection of *Staphylococcal* strains from catheter-associated infections. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, p.2151-2156, 2001.

ARCIOLA, C.R. et al. Implant infection and infection resistant materials: a mini review. **The International Journal of Artificial Organs**, v. 28, p. 1119-1125, 2005.

ASLAM, S. et al. Combination of tigecycline and n-acetylcysteine reduces biofilm-embedded bacteria on vascular catheters. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 51, p. 1556-1558, 2007.

AUBRY-DAMON, H.; SOUSSY, C.J.; COURVALIN, P. Characterization of mutations in the *rpoB* gene that confer rifampin resistance in *Staphylococcus aureus*. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v. 42, p. 2590 - 2594, 1998.

BACCHI, A. et al. comprehensive study on structure-activity relationships of rifamycins: discussion of molecular and crystal structure and spectroscopic and thermochemical properties of rifamycin O. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 41, p. 2319-2332, 1998.

BADDOUR, L.M. et al. Infective endocarditis: diagnosis, antimicrobial therapy, and management of complications: a statement for healthcare professionals from the Committee on Rheumatic Fever, Endocarditis, and Kawasaki Disease, Council on Cardiovascular Disease in the Young, and the Councils on Clinical Cardiology, Stroke, and Cardiovascular Surgery and Anesthesia, American Heart Association: endorsed by the Infectious Diseases Society of America. **Circulation**, v. 111, n. 23, p. 3167-3184, 2005.

BAIRD-PARKER, A.C. The Classification of Staphylococci and Micrococci from worldwide sources. **Journal of General Microbiology**, v. 38, p. 363-387, 1965.

BARRY, A.L.; FUCHS, P.C.; BROWN, S.D. *In vitro* activities of daptomycin against 2,789 clinical isolates from 11 North American Medical Centers. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 45, p. 1919-1922, 2001.

BAUDOUX, P. et al. Combined effect of pH and concentration on the activities of gentamicin and oxacillin against *Staphylococcus aureus* in pharmacodynamic models of extracellular and intracellular infections. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 59, p. 246-253, 2007.

BAUER, A.W.; PERRY, D.M.; KIRBY, W.M.M. Drug usage and antibiotic susceptibility of Staphylococci. **The Journal of the American Medical Association**, v. 173, p. 475-480, 1960.

BAYSTON, R.; ULLAS, G.; ASHRAF, W. Action of linezolid or vancomycin on biofilms in ventriculo peritoneal shunts *in vitro*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 56, p. 2842-2845, 2012.

BEENKEN, K.E. et al. Epistatic relationships between sarA and agr in *Staphylococcus aureus* biofilm formation. **PLoS One**, v. 5, n. 5, p. 1, 2010.

BERNARDI, A.C.A.; PIZZOLITTO, E.L.; PIZZOLITTO, A.C. Detecção da produção de *slime* por estafilococos coagulase-negativa isolados de cateter venoso central. **Revista Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 28, n. 1, p. 57-66, 2007.

BHATIA, A.; ZAHOR, S. *Staphylococcus aureus* enterotoxins: A review. **Clinical and Diagnostic Research**, v. 3, p. 188-197, 2007.

BIAVASCO, F.; VIGNAROLI, C.; VARALDO, P.E. Glycopeptide Resistance in Coagulase-Negative Staphylococci. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, v. 19, p. 403-417, 2000.

BLANCO, M.T. et al. Incubation temperatures affect adherence to plastic of *Candida albicans* by changing the cellular surface hydrophobicity. **Microbios**, v. 89, n.358, p. 23-28, 1997.

BLASER, J. et al. *In vivo* verification of *in vitro* model of antibiotic treatment of device-related infection. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 39, p.1134-1139, 1995.  
BOIVIN, J.; COSTERTON, J.W. Biofilms and biodeterioration. **Elsevier**, v. 8, p. 53-62, 1991.

BOLES, B.R.; HORSWILL, A.R. agr-mediated dispersal of *Staphylococcus aureus* biofilms. **PLoS Pathogens**, v. 4, n.4, p. e1000052, 2008.

\_\_\_\_\_. Staphylococcal biofilm disassembly. **Trends in Microbiology**, v. 19, n. 9, p. 449-455, 2011.

BORCHARDT, S.A. et al. Reaction of acylated homoserine lactone bacterial signaling molecules with oxidized halogen antimicrobials. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, n. 7, p. 3174-3179, 2001.

BOSTIC, G.D. et al.: Comparative *in vitro* and bactericidal activity of oxazolidinone antibiotics against multidrug-resistant enterococci. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 30, n. 2, p. 109-112, 1998.

BOYCE, J.M. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in hospitals and long-term care facilities: microbiology, epidemiology, and preventive measures. **Infection Control and Hospital Epidemiology**, v. 13, n. 12, p. 725-737, 1992.

BROEKHUIZEN, C.A.N. et al. *Staphylococcus epidermidis* is cleared from biomaterial implants but persists in peri-implant tissue in mice despite rifampicin/vancomycin treatment. **Journal of Biomedical Materials Research. Part A**, v. 85, n. 2, p. 498-505, 2008.

BRUMFITT, W.; HAMILTON-MILLER, J. Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. **New England Journal of Medicine**, v. 320, n. 18, p. 1188-1196, 1989.

BRYSKIER, A. Novelties in the field of anti-infectives. **Clinical Infectious Diseases**, v. 27, p. 865-883, 1998.

BURNS, C.A. Daptomycin-rifampin for a recurrent MRSA joint infection unresponsive to vancomycin-based therapy. **Scandinavian Journal of Infectious Diseases**, v. 38, n. 32, p. 133-136, 2006.

BUU-HOI, A.; GOLDSTEIN, F.W.; ACAR, J.F. Factors in gram-positive and gram-negative aerobic bacteria selected by antimicrobial therapy. **Journal Infectious Diseases**, v. 49, p. 46-55, 1986.

CERCA, N. et al. Comparative assessment of antibiotic susceptibility of coagulase-negative staphylococci in biofilm versus planktonic culture as assessed by bacterial enumeration or rapid XTT colorimetry. **Journal Antimicrobial Chemotherapy**, v. 56, p. 331-336, 2005.

CERI, H. et al. The Calgary biofilm device: New technology for rapid determination of antibiotic susceptibilities of bacterial biofilms. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 37, n. 6, p. 1771-1776, 1999.

CERI, H. et al. The MBEC Assay System: multiple equivalent biofilms for antibiotic and biocide susceptibility testing. **Methods in Enzymology**, v. 337, p. 377 - 385, 2001.

CERVERA, C. et al. Risk factors and management of gram-positive bacteraemia. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 34, n. 4, p. 26-30, 2009.



CHA, R.; BROWN, W.J.; RYBAK, M.J. Bactericidal activities of daptomycin, quinupristin-dalfopristin, and linezolid against vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* in an *in vitro* pharmacodynamic model with simulated endocardial vegetations. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 47, p. 3960–3963, 2003.

CHAMBERLAIN, A.H.L. The role of adsorbed layers in bacterial adhesion. **Biofilms. Science and Technology**, p. 59-67, 1992.

CHARACKLIS, W.G.; COOKSEY, K.E.; ALLEN, I.L. Biofilms and Microbial Fouling. **Applied Microbiology**, v. 29, p. 93-138, 1983.

CHARACKLIS, W.G.; WILDERER, P.A. Structure and function of biofilms. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, p. 387, 1989.

CHARACKLIS, W.G.; MARSHALL, K.C. Biofilms: “A Basis for an interdisciplinary approach. **Biofilms**, p. 3-15, 1990.

CHOONG, S.; WHITFIELD, H. Biofilms and their role in infections in urology. **BJU International**, v. 86, p. 935-941, 2000.

CHRISTENSEN, G.D. et al. Adherence of *slime*-producing strains of *Staphylococcus epidermidis* to smooth surfaces. **Infection and Immunity**, v. 37, n. 1, p. 318-326, 1982.

CHRISTENSEN, G.D. et al. Adherence of coagulase-negative staphylococci to plastic tissue culture plates: a quantitative model for the adherence of staphylococci to medical devices. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 22, p. 996-1006, 1985.

CHU, V.H. et al. Coagulase-negative staphylococcal prosthetic valve endocarditis—a contemporary update based on the International Collaboration on Endocarditis: prospective cohort study. **Heart**, v. 95, n. 7, p. 570-576, 2009.

CHUARD, C. et al. Successful therapy of experimental chronic foreign-body infection due to methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by antimicrobial combinations. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v. 35, p. 2611-2616, 1991.

CLOETE, T.E.; JACOBS, L.; BROZEL, V.S. The chemical control of biofouling in industrial water systems. **Biodegradation**, v. 9, p. 23-37, 1998.

CONLEY, J. et al. Biofilm formation by group a streptococci: Is there a relationship with treatment failure? **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, n. 9, p. 4043-4048, 2003.

CONRADY, D.G. et al. A zinc-dependent adhesion module is responsible for intercellular adhesion in staphylococcal biofilms. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 105, p. 19456-19461, 2008.

CORREA, C.M.C.; DAVID, C.M.N.; GONTIJO, F.P.P. Uso de antimicrobianos e resistência bacteriana em um hospital universitário do Rio de Janeiro. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 35, n. 2, p. 46-48, 1989.

CORRIGAN, R.M. et al. The role of *Staphylococcus aureus* surface protein SasG in adherence and biofilm formation. **Microbiology**, v. 153, p. 2435-2446, 2007.

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

COSTERTON, J.W.; IRVIN, R.T.; CHENG, K.J. The bacterial glycocalyx in nature and disease. **Annual Review of Microbiology**, v. 35, p. 299-324, 1981.

\_\_\_\_\_. The role of bacterial surface structures in pathogenesis. **Critical Review in Microbiology**, v. 8, p. 303-338, 1981.

COSTERTON, J.W. et al. Bacterial biofilms in nature and disease. **Annual Review of Microbiology**, v. 41, p. 435-464, 1987.

COSTERTON, J.W.; STEWART, P.S.; GREENBERG, E.P. Bacterial biofilms: A common cause of persistent infections. **Science**, v. 284, n. 5418, p. 1318-1322, 1999.

COSTERTON, J.W. A short history of the development of the biofilm concept. **ASM Press**, p. 4-19, 2004.

COUGHTER, J.P.; JOHNSTON, J.L.; ARCHER, G.L. Characterization of a staphylococcal trimethoprim resistance gene and its product. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 31, p. 1027-1032, 1987.

CRAIG, W.A. The postantibiotic effect. **Clinical Microbiology**, v. 13, p. 121-124, 1991.

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

CRAMTON, S.; GOTZ, F. Biofilm development in *Staphylococcus*. **Microbial Biofilms Washington, DC.: ASM Press**, p. 64-84, 2004.

CROSSLEY, K. et al. An outbreak of infections caused by strains of *Staphylococcus aureus* resistant to methicillin and aminoglycosides. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 139, n. 3, p. 273-279, 1979.

CUNDLIFFE, E. Self defence in antibiotic-producing organisms. **British Medical Bulletin**, v. 40, p. 61-67, 1984.

DANDEKAR, P.K. et al. Pharmacodynamic profile of daptomycin against *Enterococcus* species and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a murine thigh infection model. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 52, p. 405-411, 2003.

DARBY, C. et al. *Caenorhabditis elegans*: plague bacteria biofilm blocks food intake. **Nature**, v. 417, p. 243-244, 2002.

DAROUICHE, R.O. et al. Vancomycin penetration into biofilm covering infected prostheses and effect on bacteria. **Journal of Infectious Diseases**, v. 170, p. 720-723, 1994.

DAVEY, M.E.; O'TOOLE, G.A. Microbial biofilms: From ecology to molecular genetics. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 64, n. 4, p. 847-867, 2000.

DAVIES, P.D.O.; YEW, W.W. Recent developments in the treatment of tuberculosis. **Expert Opinion on Investigational Drugs**, v. 12, p. 1297-1312, 2003.

DEMAIN, A.L. How do antibiotic-producing microorganisms avoid suicide? **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 235, p. 601-612, 1974.

DHALIWAL, D.S.; CORDIER, J.L.; COX, L.J. Impedimetric evaluation of the efficiency of disinfectants against biofilms. **Applied Microbiology**, v. 15, p. 217-221, 2008.

DIAZ, J.C.R.; RUIZ, M.; ROYO, L.G. Int. **Journal of Antimicrobial Agents**, v. 21, p. 354, 2003.

DOMÍNGUEZ-HERRERA, J. et al. Efficacy of daptomycin versus vancomycin in an experimental foreign-body and systemic infection model caused by biofilm-producers and methicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 56, p. 613-617, 2012.

DONLAN, R.M. Biofilm Formation: A Clinically Relevant Microbiological Process. **Clinical Infectious Diseases**, v. 33, n. 8, p. 1387-1392, 2001.

DONLAN, R.M.; COSTERTON, J.W. Biofilms: Survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 15, n. 2, p. 167-193, 2002.

DOUGLAS, L.J. *Candida* biofilms and their role in infection. **Trends in Microbiology**, v. 11, p. 30-36, 2003.

DUARTE, D.; VERAS, M.A.; MARTINS, J.A. Perfil evolutivo da resistência do *Staphylococcus aureus* – experiência do Hospital Adventista Silvestre. **Programa Oficial e Resumo de Trabalhos do VIII Congresso Brasileiro de Infectologia**, p. 91:82, 1994.

DUBOIS, M. et al. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Analytical Chemistry**, v. 28, p. 350-356, 1956.

DUNNE, W.M.JR.; MASON, E.O.JR.; KAPLAN, S.L. Diffusion of rifampin and vancomycin through a *Staphylococcus epidermidis* biofilm. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.37, p. 2522-2526, 1993.

DVORCHIK, B.H. et al. Daptomycin pharmacokinetics and safety following administration of escalating doses once daily to healthy subjects. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 47, p. 1318-1323, 2003.

EVANS, D.J. et al. Susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa* and *Escherichia coli* biofilms towards ciprofloxacin: effect of specific growth rate. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 27, p. 177-184, 1991.

EVANS, R.C.; HOLMES, C.J. Effect of vancomycin hydrochloride on *Staphylococcus epidermidis* biofilm associated with silicone elastomer. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 31, p. 889-894, 1987.

FALAGAS, M. et al. Outcome of antimicrobial therapy in documented biofilm-associated infections. **Drugs**, v. 69, p. 1351-1361, 2009.

FEINMAN, S.E. Antibiotics in animal feed – Drug resistance revisited. **ASM News**, v. 62, p. 24-30, 1998.

FEY, P.D. Modality of bacterial growth presents unique targets: how do we treat biofilm-mediated infections? **Current Opinion in Microbiology**, V. 13, p. 610-615, 2010.

FLEMING, A. On the antibacterial action of cultures of a *Penicillium*, with special reference to their use in the isolation of *B. influenzae*. **Journal of Experimental Pathology**, v. 10, p. 226-236, 1980.

FLEMMING, H.C.; NEU, T.R.; WOZNIAK, D.J. The EPS Matrix: The House of Biofilm Cells. **Journal of Bacteriology**, v. 189, p. 7945-7947, 2007.

FLOSS, H.G.; YU, T.W. Rifamycin mode of action, resistance, and biosynthesis. **Chemical Reviews**, v. 105, p. 621-632, 2005.

FOSTER, T.J.; HOOK, M. Surface protein adhesins of *Staphylococcus aureus*. **Trends in Microbiology**, v. 6, p. 484-488, 1998.

FOWLER, V.G.J. et al. *Staphylococcus aureus* endocarditis: a consequence of medical progress. **JAMA: The Journal of the American Medical Association**, v. 293, p. 3012-3021, 2005.

FUX, C.A. et al. Survival strategies of infectious biofilms. **Trends in Microbiology**, v. 13, p. 34-40, 2005.

GAGNON, R.F.; RICHARDS, G.K.; SUBANG, R. Experimental *Staphylococcus epidermidis* implant infection in the mouse: kinetics of rifampin and vancomycin action. **ASAIO Journal**, v. 38, p. M596-M599, 1992.

GANDER, S. Bacterial biofilms: resistance to antimicrobial agents. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 37, p. 1047-1050, 1996.

GARRETT, D.O.M.D. et al. The Emergence of Decreased Susceptibility to Vancomycin in *Staphylococcus epidermidis*. **Infection Control and Hospital Epidemiology**, v. 20, p.167-170, 1999.

GARRISON, J.R. et al. *In vitro* and *in vivo* effects of rifampin on *Staphylococcus epidermidis* graft infections. **ASAIO Journal**, v. 43, p. 8-12, 1997.

GEESEY, G.G. et al. Microscopic examination of natural sessile bacterial populations from an alpine stream. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 23, n. 12, p. 1733-1736, 1977.

GERKE, C. et al. Characterization of the N-Acetylglucosaminyltransferase activity involved in the biosynthesis of the *Staphylococcus epidermidis* polysaccharide intercellular adhesin. **Journal of Biological Chemistry**, v. 273, n. 29, p. 18586-18593, 1998.

GIACOMETTI, A. et al. Prophylactic efficacy of linezolid alone or combined with levofloxacin and vancomycin in a rat subcutaneous pouch model of graft infection caused by *Staphylococcus epidermidis* with intermediate resistance to glycopeptides. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 52, p. 724-726, 2003.

GILLESPIE, E.L.; KUTI, J.L.; NICOLAU, D.P. Pharmacodynamics of antimicrobials: treatment optimisation. **Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology**, v. 1, p. 351-361, 2005.

GOMES, F. et al. Farnesol as antibiotics adjuvant in *Staphylococcus epidermidis* control in vitro. **The American Journal of the Medical Sciences**, v. 341, p. 191-195 2011.

GOMES, F.I.A. et al. Effect of farnesol on planktonic and biofilm cells of *Staphylococcus epidermidis*. **Current Microbiology**, v. 59, p. 118-122, 2009.

GOODMAN, A.E.; MARSHALL, K.C. Genetic responses of bacteria at surface. **Microbial Biofilms**, p. 81-95, 1995.

GOTZ, F.; PETERS, G. Colonization of medical devices by coagulase-negative staphylococci. **ASM Press**, p. 55-88, 2000.

GRISTINA, A.G. Biomaterial-centered infection: microbial adhesion versus tissue integration. **Science**, v. 237, p. 1588-1595, 1987.

HAJDU, S. et al. Effects of vancomycin, daptomycin, fosfomicin, tigecycline, and ceftriaxone on *Staphylococcus epidermidis* biofilms. **Journal of Orthopaedic Research**, v. 27, p. 1361-1365, 2009.

HALEY, R.W. et al. The emergence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections in united states hospitals. **Annals of Internal Medicine**, v. 97, p. 297-308, 1982.

HALL-STOODLEY, L.; COSTERTON, J.W.; STOODLEY, P. Bacterial biofilms: from the Natural environment to infectious diseases. **Nature Reviews Microbiology**, v. 2, p. 95-108, 2004.

HALL-STOODLEY, L.; STOODLEY, P. Evolving concepts in biofilm infections. **Cellular Microbiology**, v. 11, p. 1034-1043, 2009.

HEILMANN, C. et al. Characterization of Tn917 insertion mutants of *Staphylococcus epidermidis* affected in biofilm formation. **Infection and Immunity**, v. 64, n. 1, p. 277-282, 1996.

HEILMANN, C. et al. Molecular basis of intercellular adhesion in the biofilm-forming *Staphylococcus epidermidis*. **Molecular Microbiology**, v. 20, p. 1083-1091, 1996.

HEILMANN, C.; GOTZ, F. Further characterization of *Staphylococcus epidermidis* transposon mutants deficient in primary attachment or intercellular adhesion. **Zentralblatt für Bakteriologie**, v. , n. 1-2, p. 287:69-83, 1998.

HEILMANN, C. et al. Identification and characterization of a novel autolysin (Aae) with adhesive properties from *Staphylococcus epidermidis*. **Microbiology**, v. 149, p. 2769-2778, 2003.

HENRICI, A.T. Studies of fresh water bacteria. **Journal of Bacteriology**, v. 25, p. 277-286, 1933.

HIRAMATSU, K. et al. Dissemination in Japanese hospitals of strains of *Staphylococcus aureus* heterogeneously resistant to vancomycin. **Lancet**, v. 350, p. 1670-1673, 1997a.

HIRAMATSU, K. et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical strain with reduced vancomycin susceptibility. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 40, p. 135-136, 1997b.

HOPE, R. et al. Non-susceptibility trends among staphylococci from bacteraemias in the UK and Ireland, 2001-06. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 62, p. 65-74, 2008.

HOWDEN, B.P. et al. Treatment outcomes for serious infections caused by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* with reduced vancomycin susceptibility. **Clinical Infectious Diseases**, v. 38, p. 521-528, 2004.

HOWE, R.A. et al. Expression and detection of hetero-vancomycin resistance in *Staphylococcus aureus*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 44, p. 675-678, 1999.

HOYLE, B.D.; WONG, C.K.W.; COSTERTON, J.W. Disparate efficacy of tobramycin on Ca<sup>2+</sup>-, Mg<sup>2+</sup>-, and HEPES-treated *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 38, p. 1214-1218, 1992.

HUANG, Y.T. et al. Bacteremia and infective endocarditis caused by a non-daptomycin-susceptible, vancomycin-intermediate, and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strain in taiwan. **Journal Clinical Microbiology**, v. 46, p. 1132-1136, 2008.

HUANG, Y.T. et al. Daptomycin susceptibility of unusual gram-positive bacteria: comparison of results obtained by the Etest and the broth microdilution method. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 51, p. 1570-1572, 2007

HUSEBY, M.J. et al. Beta toxin catalyzes formation of nucleoprotein matrix in staphylococcal biofilms. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 107, p. 14407-14412, 2010.

ISIKLAR, Z.U. et al. Two-stage treatment of chronic staphylococcal orthopaedic implant-related infections using vancomycin impregnated PMMA spacer and rifampin containing antibiotic protocol. **Bulletin Hospital for Joint Diseases**, v. 58, p. 79-85, 1999.

JEFFERSON, K.K.; GOLDMANN, D.A.; PIER, G.B. Use of confocal microscopy to analyze the rate of vancomycin penetration through *Staphylococcus aureus* biofilms. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 49, p. 2467-2473, 2005.

JEVITT, L.A. et al. *in vitro* activities of daptomycin, linezolid, and quinupristin-dalfopristin against a challenge panel of staphylococci and enterococci, including vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus* and vancomycin-resistant *Enterococcus faecium*. **Microbial Drug Resistance**, v. 9, p. 389-393, 2003.

JOH, D. et al. Role of fibronectin-binding MSCRAMMs in bacterial adherence and entry into mammalian cells. **Matrix Biology**, v. 18, p. 211-223, 1999.

JOHN, J.F.; HARVIN, A.M. History and evolution of antibiotic resistance in coagulase-negative staphylococci: susceptibility profiles of new anti-staphylococcal agents. **Therapeutics and Clinical Risk Management**, v. 3, p. 1143-1152, 2007.

JOHNSON, A. et al. Emerging linezolid-resistant *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* isolated from two austrian patients in the same intensive care unit european. **Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, v. 21, p. 751-754, 2002.

JOHNSTON, M.D.; JONES, M.V. Disinfection tests with intact biofilms: combined use of the Modified Robbins Device with impedance detection. **Journal of Microbiological Methods**, v. 21, p. 15-26, 1995.

JONES, R.N. Global epidemiology of antimicrobial resistance among community-acquired and nosocomial pathogens: a five-year summary from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (1997-2001). **Seminars in Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 24, p. 121-134, 2003.

JONES, S.M. et al. Effect of vancomycin and rifampicin on meticillin-resistant *Staphylococcus aureus* biofilms. **The Lancet**, v. 357, p. 40-41, 2001.

KAATZ, G.W.; SEO, S.M. Mechanisms of fluoroquinolone resistance in genetically related strains of *Staphylococcus aureus*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 41, p. 2733-2737, 1997.

KAO, L.W. et al. What is the rate of adverse events after oral N-acetylcysteine administered by the intravenous route to patients with suspected acetaminophen poisoning? **Annals of emergency medicine**, v. 42, p. 741-750, 2003.

KAPLAN, J.B. et al. Enzymatic Detachment of *Staphylococcus epidermidis* biofilms. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 48, p. 2633-2636, 2004.

KIRBY, A.E.; GARNER, K.; LEVIN, B.R. The relative contributions of physical structure and cell density to the antibiotic susceptibility of bacteria in biofilms. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, 56:2967-2975, 2012.

KLOOS, W.E.; BANNERMAN, T.L. *Staphylococcus* and *Micrococcus*. **Manual of Clinical Microbiology**, p. 264-282, 1999.

KONEMAN, E.W. et al. Diagnóstico microbiológico. **MEDSI**, p. 5, 2001.

KRISHNASAMI, Z. et al. Management of hemodialysis catheter-related bacteremia with an adjunctive antibiotic lock solution. **Kidney International**, v. 61, n. 3, p. 1136-1142, 2002.

KUHN, D.M. et al. Uses and limitations of the xtt assay in studies of *Candida* growth and metabolism. **Journal Clinical Microbiology**, v. 41, p. 506-508, 2003.

LACEY, R.W. Genetic basis, epidemiology, and future significance of antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus*: a review. **Journal of Clinical Pathology**, v. 26, p. 899-913, 1973.

LACEY, R.W. Antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus* and streptococci. **British Medical Bulletin**, v. 40, p. 77-83, 1984.

LAPLANTE, K.L.; MERMEL, L.A. *In vitro* activity of daptomycin and vancomycin lock solutions on *Staphylococcal* biofilms in a central venous catheter model. **Nephrology Dialysis Transplantation**, v. 22, p. 2239-2246, 2007.

LASA, I.; PENADÉS, J. Bap: A family of surface proteins involved in biofilm formation. **Research in Microbiology**, v. 157, p. 99-107, 2006.

LATASA, C. et al. Biofilm-associated proteins. **Comptes Rendus Biologies**, v. 329, p. 849-857, 2006.

LAUDERDALE, K.J. et al. Biofilm dispersal of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* on orthopedic implant material. **Journal of Orthopaedic Research**, v. 28, p. 55-61, 2010.

LAWRENCE, J.R. et al. Optical sectioning of microbial biofilms. **The Journal of Bacteriology**, v. 173, p. 6558-6567, 1991.

LEUENBERGER, P. et al. Management 1997 of chronic obstructive pulmonary disease. Working Group of the Swiss Society of Pneumology. **Schweizerische Medizinische Wochenschrift**, v. 127, n. 18, p. 766-782, 1997.

LEVINE, D.P. Vancomycin: A History. **Clinical infectious diseases**, v. 42, p. S5-S12, 2006.

LEWIS, K. Riddle of biofilm resistance. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 45, p. 999-1007, 2001.

LICATA, L. et al. Comparison of the postantibiotic and postantibiotic sub-MIC effects of levofloxacin and ciprofloxacin on *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus pneumoniae*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 41, p. 950-955, 1997.

LINTON, A.H. Antibiotic-resistant bacteria in animal husbandry. **British Medical Bulletin**, v. 40, p. 91-95, 1984.

LUCET, J.C. et al. Treatment of experimental foreign body infection caused by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 34, p. 2312-2317, 1990.

MACK, D.; SIEMSEN, N.; LAUFS, R. Parallel induction by glucose of adherence and a polysaccharide antigen specific for plastic-adherent *Staphylococcus epidermidis*: evidence for



functional relation to intercellular adhesion. **Infection and Immunity**, v. 60, p. 2048-2057, 1992.

MACK, D. et al. Characterization of transposon mutants of biofilm-producing *Staphylococcus epidermidis* impaired in the accumulative phase of biofilm production: genetic identification of a hexosamine-containing polysaccharide intercellular adhesin. **Infection and Immunity**, v. 62, p. 3244-3253, 1994.

MACK D, et al.: The intercellular adhesin involved in biofilm accumulation of *Staphylococcus epidermidis* is a linear beta-1,6-linked glucosaminoglycan: purification and structural analysis. **The Journal of Bacteriology**, v. 178, p. 175-183, 1996a.

MACK D, et al.: Association of biofilm production of coagulase-negative staphylococci with expression of a specific polysaccharide intercellular adhesin. **Journal Infectious Diseases**, v. 174, p. 881-884, 1996b.

MACK, D. Molecular mechanisms of *Staphylococcus epidermidis* biofilm formation. **Journal of Hospital Infection**, v. 43, p. S113-S125, 1999.

MACK, D. et al. Identification of three essential regulatory gene loci governing expression of *Staphylococcus epidermidis* polysaccharide intercellular adhesin and biofilm formation. **Infection and Immunity**, v. 68, p. 3799-3807, 2000.

MALOUIN, F.; BRYAN, L.E. Modification of penicillin-binding proteins as mechanisms of beta-lactam resistance. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 30, p. 1-5, 1986.

MAPLE, P.A.C.; HAMILTON-MILLER, J.M.T.; BRUMFITT, W. World-wide antibiotic resistance in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **The Lancet**, v. 333, p. 537-540, 1989.

MARCHESE, A. et al. Effect of fosfomycin alone and in combination with N-acetylcysteine on *E. coli* biofilms. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 22, p. 95-100, 2003.

MARSHALL, K.C.; STOUT, R.; MITCHELL, R. Mechanism of the initial events in the sorption of marine bacteria to surfaces. **Journal of General Microbiology**, v. 68, p. 337-348, 1971.

MARTI, M. et al. Extracellular proteases inhibit protein-dependent biofilm formation in *Staphylococcus aureus*. **Microbes and Infection**, v. 12, p. 55-64, 2010.

MAZOR, D. et al. Red blood cell permeability to thiol compounds following oxidative stress. **European Journal of Haematology**, v. 57, p. 241-246, 1996.

MCKENNEY, D. et al. The *ica* locus of *Staphylococcus epidermidis* encodes production of the capsular polysaccharide/adhesin. **Infection and Immunity**, v. 66, p. 4711-4720, 1998.

MCKENNEY, D. et al. Broadly protective vaccine for *Staphylococcus aureus* based on an in vivo-expressed antigen. **Science**, v. 284, p. 1523-1527, 1999.

MERINO, N. et al. Protein A-mediated multicellular behavior in *Staphylococcus aureus*. **Journal of Bacteriology**, v. 191, p. 832-843, 2009.

MERMEL, L.A. et al. Guidelines for the management of intravascular catheter-related infections. **Clinical Infectious Diseases**, v. 32, p. 1249-1272, 2001.

MERMEL, L.A. et al. Clinical practice guidelines for the diagnosis and management of intravascular catheter-related infection: 2009 update by the infectious diseases society of america. **Clinical Infectious Diseases**, v. 49, n. 1, p. 1-45, 2010.

MICK, V. et al. Molecular characterization of resistance to rifampicin in an emerging hospital-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clone ST228, Spain. **BMC Microbiology**, v. 10, p. 68, 2010.

MITCHISON, D.A. The Diagnosis and Therapy of Tuberculosis During the Past 100 Years. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 171, p. 699-706, 2005.

MOELLERING, R.C. The enterococcus: a classic example of the impact of antimicrobial resistance on therapeutic options. **Journal Antimicrobial and Chemotherapy**, v. 28, p. 1-12, 1991.

\_\_\_\_\_. Current treatment options for community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection. **Clinical Infectious Diseases**, v. 46, p. 1032 - 1037, 2008.

MONZON, M. et al. Synergy of different antibiotic combinations in biofilms of *Staphylococcus epidermidis*. **Journal Antimicrobial and Chemotherapy**, v. 48, p. 793-801, 2001.

MOREIRA, B.M.; DAUM RS. Antimicrobial resistance in staphylococci. **Pediatric Clinics North America**, v. 42, p. 619-648, 1995.

MOSTELLER, T.M.; BISHOP, J.R. Sanitizer efficacy against attached bacteria in a milk biofilm. **Journal of Food Protection**, v. 56, p. 34-41, 1993.

MULAZIMOGLU, L.; DRENNING, S.D.; YU, V.L. *In vitro* activities of two novel oxazolidinones (U100592 and U100766), a new fluoroquinolone (trovafloxacin), and dalfopristin-quinupristin against *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 40, p. 2428-2430, 1996.

MULLER, E. et al. Isolation and characterization of transposon mutants of *Staphylococcus epidermidis* deficient in capsular polysaccharide/adhesin and *slime*. **Infection and Immunity**, v. 61, p. 551-558, 1993.

MULLIGAN, M.E. et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: a consensus review of the microbiology, pathogenesis, and epidemiology with implications for prevention and management. **The American journal of medicine**, v. 94, p. 313-328, 1993.

MURILLO, O. et al. Efficacy of high doses of daptomycin versus alternative therapies against experimental foreign-body infection by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 53, p. 4252-4257, 2009.

MURRAY, P.R. *Microbiologia Médica*, Elsevier, p. 4, 2004.

- NEU, H.C. The crisis in antibiotic resistance. **Science**, v. 257, p. 1064-1073, 1992.
- NICKEL, J.C. et al. Tobramycin resistance of *Pseudomonas aeruginosa* cells growing as a biofilm on urinary catheter material. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 27, p. 619-624, 1985.
- NIVENS, D.E. et al. Role of alginate and its O-acetylation in formation of *Pseudomonas aeruginosa* microcolonies and biofilms. **Journal of Bacteriology**, v. 183, p. 1047-1057, 2001.
- NOSZAL, B.; VISKY, D.; KRASZNI, M. Population, Acid-base, and redox properties of n-acetylcysteine conformers. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 43, p. 2176-2182, 2000.
- O'GARA, J.P.; HUMPHREYS, H. *Staphylococcus epidermidis* biofilms: importance and implications. **Journal of Medical Microbiology**, v. 50, p. 582-587, 2001.
- O'NEILL, E. et al. A novel *Staphylococcus aureus* biofilm phenotype mediated by the fibronectin-binding proteins, FnBPA and FnBPB. **Journal of Bacteriology**, v. 190, p. 3835-3850, 2008.
- O'TOOLE, G.; KAPLAN, H.B.; KOLTER, R. Biofilm formation as microbial development. **Annual Review Microbiology**, v. 54, p. 49-79, 2000.
- OLOFSSON, A.C.; HERMANSSON, M.; ELWING, H. N-acetyl-L-cysteine affects growth, extracellular polysaccharide production, and bacterial biofilm formation on solid surfaces. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, p. 4814-4822, 2003.
- \_\_\_\_\_. Use of a quartz crystal microbalance to investigate the antiadhesive potential of N-acetyl-L-cysteine. **Applied Environmental Microbiology**, v. 71, p. 2705-2712, 2005.
- OLSON ME, et al.: Biofilm bacteria: formation and comparative susceptibility to antibiotics. **Canadian Journal of Veterinary Research**, v. 66, n. 2, p. 86-92, 2002.
- OLSON, M.E. et al. Adherence of *Staphylococcus epidermidis* to biomaterials is augmented by PIA. **Clinical Orthopaedics and Related Research**, v. 451, p. 21-24, 2006.
- OTTO, M. Virulence factors of the coagulase-negative staphylococci. **Frontiers in Bioscience**, v. 9, p. 841 - 863, 2004.
- \_\_\_\_\_. Staphylococcal Biofilms. **Current Topics in Microbiology and Immunology**, v. 322, p. 207-228, 2008.
- PAI, M.P. et al. Risk factors associated with the development of infection with linezolid- and vancomycin-resistant *Enterococcus faecium*. **Clinical Infectious Diseases**, v. 35, p. 1269-1272, 2002.
- PARKAR, S.G. et al. Factors influencing attachment of thermophilic bacilli to stainless steel. **Journal of Applied Microbiology**, v. 90, p. 901-908, 2001.
- PARRA-RUIZ, J. et al. Activities of high-dose daptomycin, vancomycin, and moxifloxacin alone or in combination with clarithromycin or rifampin in a novel in vitro model of

*Staphylococcus aureus* biofilm. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 54, p. 4329-4334, 2010.

PARRA-RUIZ, J. et al. Activity of linezolid and high-dose daptomycin, alone or in combination, in an in vitro model of *Staphylococcus aureus* biofilm. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 67, n. 11, 2012.

PATTI, J.M. et al. MSCRAMM-mediated adherence of microorganisms to host tissues. **Annual Review Microbiology**, v. 48, p. 585-617, 1994.

PEREIRA, M.S.V. et al. Post-antibiotic effect of the fluoroquinolones isolated and associated to cephalosporin on samples of *Staphylococcus aureus* derived to bovine cattle and human nosocomial. **ACSA**, v. 4, p. 18-26, 2008.

PEREZ-GIRALDO, C. et al. Influence of N-acetylcysteine on the formation of biofilm by *Staphylococcus epidermidis*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 39, p. 643-646, 1997.

PERLROTH, J. et al. Adjunctive use of rifampin for the treatment of *S. aureus* infections. **Archives of Internal Medicine**, v. 168, p. 805 - 819, 2008.

PETERS, G.; LOCCI, R.; PULVERER, G. Adherence and growth of coagulase-negative staphylococci on surfaces of intravenous catheters. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 146, p. 479-482, 1982.

PHILIPPE, M.; YOK, A.Q. Infective endocarditis. **Lancet**, v. 363, p. 139-149, 2004.

PILLAI, S.K. et al. Linezolid resistance in *Staphylococcus aureus*: characterization and stability of resistant phenotype. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 186, p. 1603-1607, 2002.

PINTO, C.A.G. et al. Comportamento microbiológico das infecções comunitárias no Hospital Municipal Odilon Behrens (HNOB)  $\frac{3}{4}$  jan/94 a dez/95. **Programa Científico Oficial do IX Congresso Brasileiro de Infectologia**, v. 413, p. 184, 1996.

POOTOOLAL, J.; NEU, J.; WRIGHT, G.D. Glycopeptide antibiotic resistance. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v. 42, p. 381-408, 2002.

PRESTERL, E. et al. Effects of azithromycin in combination with vancomycin, daptomycin, fosfomicin, tigecycline, and ceftriaxone on *Staphylococcus epidermidis* biofilms. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 53, p. 3205-3210, 2009

PROSSER, B.L. et al. Method of evaluating effects of antibiotics on bacterial biofilm. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 31, p. 1502-1506, 1987.

PRYDAL, J.I. et al. The pharmacokinetics of linezolid in the non-inflamed human eye. **The British Journal of Ophthalmology**, v. 89, p. 1418-1419, 2005.

QU, Y. et al. Antibiotic susceptibility of coagulase-negative staphylococci isolated from very low birth weight babies: comprehensive comparisons of bacteria at different stages of biofilm formation. **Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials**, p. 9-16, 2010.

RAAD, I. et al. Comparative activities of daptomycin, linezolid, and tigecycline against catheter-related methicillin-resistant *Staphylococcus* bacteremic isolates embedded in biofilm. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 51, p. 1656-1660, 2007.

RANGEL, E. et al. Avaliação das culturas de secreções do laboratório do Hospital Universitário de Brasília (HUB)-DF e do perfil de resistência aos antimicrobianos, de outubro/93 a março/94. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 28, p. 263, 1995.

REHM, B.H.A.; VALLA, S. Bacterial alginates: biosynthesis and applications. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 48, p. 281-288, 1997.

REID, G. et al. Prevention of urinary tract infections in rats with an indigenous *Lactobacillus casei* strain. **Infection and Immunity**, v. 49, p. 320-324, 1985.

REID, G.; DAVIDSON, R.; DENSTEDT, J.D. XPS, SEM and EDX analysis of conditioning film deposition onto ureteral stents. **Surface and Interface Analysis**, v. 21, p. 581-586, 1994.

RICKARD, A.H. et al. Bacterial coaggregation: an integral process in the development of multi-species biofilms. **Trends in Microbiology**, v. 11, p. 94-100, 2003.

RIJNDERS, B.J. et al. Treatment of long-term intravascular catheter-related bacteraemia with antibiotic lock: randomized, placebo-controlled trial. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 55, p. 90-94, 2005.

RYBAK, M.J. et al.: *In vitro* activities of daptomycin, vancomycin, linezolid, and quinupristin-dalfopristin against staphylococci and enterococci, including vancomycin intermediate and resistant strains. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 44, p. 1062-1066, 2000.

SADER, H. Resistência bacteriana. **Laboratórios Pfizer**, n. 1, 1998.

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

SAFDAR, N.; ANDES, D.; CRAIG, W.A. *In vivo* pharmacodynamic activity of daptomycin. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 48, p. 63 - 68, 2004.

SAGINUR, R. et al. Multiple combination bactericidal testing of *Staphylococcal* biofilms from implant-associated infections. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 50, p. 55-61, 2006.

SANTOS FILHO, L.; FREITAS, F.I.S.; SIQUEIRA, JR.J.P. Evolution of drug-resistance in *Staphylococcus aureus* from a brazilian university hospital. **Folha Medica (Br)**, v. 108, p. 101-103, 1994.

SAUER, K. et al. *Pseudomonas aeruginosa* displays multiple phenotypes during development as a biofilm. **Journal of Bacteriology**, v. 184, p. 1140-1154, 2002.

SAUNDERS, JR. Genetics and evolution of antibiotic resistance. **British Medical Bulletin**, v. 40, p. 54-60, 1984.

SCHAKENRAAD, J.M. et al. The effect of protein adsorption on substratum surface free energy, infrared absorption and cell spreading. **Biofouling**, v. 1, p. 193-201, 1989.

SCHWANDT, L.Q. et al. Prevention of biofilm formation by dairy products and N-acetylcysteine on voice prostheses in an artificial throat. **Acta Oto-laryngologica**, v. 124, p. 726-731, 2004.

SHEFFNER, A.L. The reduction *in vitro* in viscosity of mucoprotein solutions by a new mucolytic agent, N-acetyl-L-cysteine. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 106, p. 298-310, 1963.

SHIRO, H. et al. Transposon mutants of *Staphylococcus epidermidis* deficient in elaboration of capsular polysaccharide/adhesin and *slime* are avirulent in a rabbit model of endocarditis. **Journal Infectious Diseases**, v. 169, p. 1042-1049, 1994.

SIAPAKAS, N.M. et al. Optimal assessment and management of chronic obstructive pulmonary disease (COPD). The European Respiratory Society Task Force. **European Respiratory Journal**, v. 8, p. 1398-1420, 1995.

SILVERMAN, J.A. et al. Resistance studies with daptomycin. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 45, p. 1799-1802, 2001.

SILVERMAN, J.A.; PERLMUTTER, N.G.; SHAPIRO, H.M. Correlation of daptomycin bactericidal activity and membrane depolarization in *Staphylococcus aureus*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 47, p. 2538-2544, 2003.

SMELTZER, M.S.; GILLASPY, A.F. Molecular pathogenesis of staphylococcal osteomyelitis. **Poultry Science**, v. 79, p. 1042-1049, 2000.

SNYDMAN, D.R. et al. Comparative *in vitro* activities of daptomycin and vancomycin against resistant gram-positive pathogens. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 44, p. 3447-3450, 2000.

SOUSA, C. et al. Reduction of *Staphylococcus epidermidis* adhesion to indwelling medical devices: a simple procedure. **Brasilian Journal of Biomedical Science**, v. 65, p. 184-190, 2008.

SOUSA, C.; TEIXEIRA, P.; OLIVEIRA, R. The role of extracellular polymers on *Staphylococcus epidermidis* biofilm biomass and metabolic activity. **Journal of Basic Microbiology**, v. 49, p. 363-370, 2009.

SPOERING, A.L.; LEWIS, K. Biofilms and planktonic cells of *Pseudomonas aeruginosa* have similar resistance to killing by antimicrobials. **Journal of Bacteriology**, v. 183, p. 6746-6751, 2001.

STANLEY, N.R.; LAZAZZERA, B.A. Environmental signals and regulatory pathways that influence biofilm formation. **Molecular Microbiology**, v. 52, p. 917-924, 2004.

STEIN, G.E. et al. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of linezolid in obese patients with cellulitis. **Annual of Pharmacotherapy**, v. 39, p. 427-432, 2005.

STEY, C. et al. The effect of oral N-acetylcysteine in chronic bronchitis: a quantitative systematic review. **European Respiratory Journal**, v. 16, p. 253-262, 2000.

STOCK, J.B.; STOCK, A.M.; MOTTONEN, J.M. Signal transduction in bacteria. **Nature**, v. 344, p. 395-400, 1990.

STOODLEY, P. et al. Biofilms as complex differentiated communities. **Annual Review Microbiology**, v. 56, p. 187-209, 2002.

STUBBINGS, W.; LABISCHINSKI, H. New antibiotics for antibiotic-resistant bacteria. **Biology Reports**, p. 1:40, 2009.

SUASSUNA, I.; SUASSUNA, I.R. Perspectivas do emprego clínico dos antibióticos. **Tribuna Médica**, v. 14, p. 10-17, 1971.

SVENSSON, E.; HANBERGER, H.; NILSSON, L.E. Pharmacodynamic effects of antibiotics and antibiotic combinations on growing and nongrowing *Staphylococcus epidermidis* cells. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 41, p. 107-111, 1997a.

SVENSSON, E. et al. Factors affecting development of rifampicin resistance in biofilm-producing *Staphylococcus epidermidis*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 39, p. 817-820, 1997b.

SWARTZ, M.N. Use of antimicrobial agents and drug resistance. **New England Journal of Medicine**, v. 337, p. 491-492, 1997.

TETZ, G.V.; ARTEMENKO, N.K.; TETZ, V.V. Effect of DNase and antibiotics on biofilm characteristics. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 53, p. 1204-1209, 2009.

TIMMERMAN, C.P. et al. Characterization of a proteinaceous adhesin of *Staphylococcus epidermidis* which mediates attachment to polystyrene. **Infection and Immunity**, v. 59, p. 4187-4192, 1991.

TOROK, E.; DAY, N. *Staphylococcal* and *Streptococcal* infections. **Medicine**, v. 33, p. 97-100, 2005.

TRABULSI, L.R.; ALTERTHUM, F. Microbiologia. **Elsevier**, v. 5, 2005.

TRAUTNER, B.W.; DAROUICHE, R.O. Catheter-associated infections: Pathogenesis affects prevention. **Archives of Internal Medicine**, v. 164, p. 842-850, 2004.

UCKAY, I. et al. Foreign body infections due to *Staphylococcus epidermidis*. **Annals of Medicine**, v. 41, p. 109-119, 2009.

VADYVALOO, V.; OTTO, M. Molecular genetics of *Staphylococcus epidermidis* biofilms on indwelling medical devices. **International Journal of Artificial Organs**, v. 28, p. 1069-1078, 2005.

VAN WAMEL, W.J.B. et al. The innate immune modulators staphylococcal complement inhibitor and chemotaxis inhibitory protein of staphylococcus aureus are located on beta-hemolysin-converting bacteriophages. **Journal of Bacteriology**, v. 188, n. 4, p. 1310-1315, 2006.

VARELA, N.P. et al. Comparison of agar dilution and E-test for antimicrobial susceptibility testing of *Campylobacter coil* isolates recovered from 80 Ontario swine farms. **Canadian Journal of Veterinary Research**, v. 72, n. 2, p. 168-174, 2008.

VEENSTRA, G.J. et al. Ultrastructural organization and regulation of a biomaterial adhesin of *Staphylococcus epidermidis*. **Journal of Bacteriology**, v. 178, p. 537-541, 1996.

VON EIFF, C.; PETERS, G.; HEILMANN, C. Pathogenesis of infections due to coagulase-negative staphylococci. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 2, p. 677-685, 2002.

VUONG, C.; OTTO, M. *Staphylococcus epidermidis* infections. **Microbes and Infection**, v. 4, p. 481-489, 2002.

VUONG, C. et al. A crucial role for exopolysaccharide modification in bacterial biofilm formation, immune evasion, and virulence. **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, p. 54881-54886, 2004.

WALDVOGEL, F.A. New Resistance in *Staphylococcus aureus*. **New England Journal of Medicine**, v. 340, p. 556-557, 1999.

WANG, R. et al. *Staphylococcus epidermidis* surfactant peptides promote biofilm maturation and dissemination of biofilm-associated infection in mice. **Journal of Clinical Investigation**, v. 121, p. 238-248, 2011.

WANG, X.; PRESTON, J.F.I.; ROMEO, T. The pgaABCD locus of *Escherichia coli* promotes the synthesis of a polysaccharide adhesin required for biofilm formation. **Journal of Bacteriology**, v. 186, p. 2724-2734, 2004.

WEINSTEIN, R.A.; DAROUICHE, R.O. Device-associated infections: A macroproblem that starts with microadherence. **Clinical Infectious Diseases**, v. 33, p. 1567-1572, 2001.

WELLS, C.L. et al. Relation between antibiotic susceptibility and ultrastructure of *Staphylococcus aureus* biofilms on surgical suture. **Surgical infections**, v. 12, p. 297-305, 2011.

WILCOX, M.H. et al. In situ measurement of linezolid and vancomycin concentrations in intravascular catheter-associated biofilm. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 47, p. 171-175, 2001.

WISE, R.; ANDREWS, J.M.; ASHBY, J.P. Activity of daptomycin against gram-positive pathogens: a comparison with other agents and the determination of a tentative breakpoint. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 48, p. 563-567, 2001.



WISPLINGHOFF, H. et al. Nosocomial bloodstream infections in us hospitals: analysis of 24,179 cases from a prospective nationwide surveillance study. **Clinical Infectious Diseases**, v. 39, p. 309-317, 2004.

WITTE, W. Medical consequences of antibiotic use in agriculture. **Science**, v. 279, p. 996-997, 1998.

YAO, Y.; STURDEVANT, D.E.; OTTO, M. Genomewide analysis of gene expression in *Staphylococcus epidermidis* biofilms: insights into the pathophysiology of *S. epidermidis* biofilms and the role of phenol-soluble modulins in formation of biofilms. **Journal of Infectious Diseases**, v. 191, p. 289-298, 2005.

ZHANG, Y. The magic bullets and tuberculosis drug targets. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v. 45, p. 529-564, 2004.

ZHAO, T.; LIU, Y. N-acetylcysteine inhibit biofilms produced by *Pseudomonas aeruginosa*. **BMC Microbiology**, v. 10, p. 140, 2010.

ZHENG, Z.; STEWART, P.S. Penetration of rifampin through *Staphylococcus epidermidis* biofilms. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 46, p. 900-903, 2002.

ZIEBUHR, W. et al. A novel mechanism of phase variation of virulence in *Staphylococcus epidermidis*: evidence for control of the polysaccharide intercellular adhesin synthesis by alternating insertion and excision of the insertion sequence element 15256. **Molecular Microbiology**, v. 32, n. 2, p. 345-356, 1999.

ZIMMERLI, W.; TRAMPUZ, A.; OCHSNER, P.E. Prosthetic-Joint Infections. **New England Journal of Medicine**, v. 351, p. 1645-1654, 2004.

ZOBELL, C.E. The effect of solid surfaces upon bacterial activity. **Journal of Bacteriology**, v. 46, p. 39, 1943.

ZULUAGA, A.F. et al. Etiologic diagnosis of chronic osteomyelitis: a prospective study. **Archives of Internal Medicine**, v. 166, n. 1, p. 95-100, 2006.

# **Anexos**

## **Produções Científicas**

## Produções Científicas

Todos os resultados desta tese foram articulados e publicados em artigos científicos e em anais de eventos.

## Artigos Científicos

**Anexo A** - N-acetylcysteine and vancomycin alone and in combination against staphylococci biofilm. **Bruna Leite**; Fernanda Gomes; Poliana Melo; Clovis Souza; Pilar Teixeira; Rosário Oliveira; Elisabeth Pizzolitto. *Revista Brasileira de Engenharia Biomédica*, 29(2), 2013.

### Abstract

The ability of staphylococci to produce biofilm is an important virulence mechanism that allows bacteria both to adhere and to live on artificial surfaces and to resist to the host immune factors and antibiotics. Staphylococcal infections have become increasingly difficult to treat due their antibiotic resistance. Therefore, there is a continuous need for new and effective treatment alternatives against staphylococcal infections. The main goal of this study was to test N-acetylcysteine (NAC) and vancomycin alone and in combination against *S. epidermidis* and *S. aureus* biofilms. Biofilms were treated with NAC at minimum inhibitory concentration (MIC) and 10xMIC concentrations and vancomycin at MIC and peak serum concentrations. The use of NAC 10xMIC alone showed a significant antibactericidal effect, promoting a 4-5 log<sub>10</sub> CFU/mL reduction in biofilm cells. The combination of NAC 10xMIC with vancomycin (independently of the concentration used) reduced significantly the number of biofilm cells for all strains evaluated (5-6 log<sub>10</sub>). N-acetylcysteine associated to vancomycin can be a potential therapeutic strategy in the treatment of infections associated to biofilms of *S. epidermidis* or *S. aureus*.

**Anexo B** - Combined effect of linezolid and N-acetylcysteine against *Staphylococcus epidermidis* biofilms. **Leite B**, Gomes F, Teixeira P, Souza C, Pizzolitto E, Oliveira R. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 2013.

### **Abstract**

*Staphylococcus epidermidis* is an organism commonly associated with infections caused by biofilms. Biofilms are less sensible to antibiotics and therefore are more difficult to eradicate. Linezolid and N-acetylcysteine (NAC), have demonstrated to be active against gram-positive microorganisms. Therefore and since linezolid and NAC have different modes of action, the main objective of this work was to investigate the single and synergistic effect of linezolid and NAC against *S. epidermidis* biofilms. This work reports the in vitro effect of linezolid and NAC against *S. epidermidis* biofilms, treated with MIC ( $4\text{mg ml}^{-1}$ ) and 10xMIC of NAC, and MIC ( $1\mu\text{g ml}^{-1}$ ) and peak serum concentration (PS= $18\mu\text{g ml}^{-1}$ ) of linezolid alone and in combination. After exposure of *S. epidermidis* biofilms to linezolid and/or NAC for 24 h, several biofilm parameters were evaluated, namely the number of cultivable cells [colony forming unit (CFU) enumeration], total biofilm biomass and cellular activity. When tested alone, NAC at 10xMIC was the most effective agent against *S. epidermidis* biofilms. However, the combination linezolid (MIC) + NAC (10xMIC) showed a synergistic effect and was the most biocidal treatment tested, promoting a 5 log reduction in the number of biofilm viable cells. This combination seems to be a potential candidate to combat infections caused by *S. epidermidis* biofilms, namely as a catheter lock solution therapy.

**Anexo C** - *S. epidermidis* biofilms control by N-acetylcysteine (NAC) and rifampicin. **Leite B, Gomes F, Teixeira P, Souza C, Pizzolitto E, Oliveira R.** *American journal of therapeutics*, 20(4):322-8, 2011.

### **Abstract**

Medical device-associated infections caused by *Staphylococcus epidermidis* usually involve biofilm formation and its eradication is particularly challenging. Although rifampicin has been proving to be one of the most effective antibiotics against *S. epidermidis* biofilms, its use as a single agent can lead to the acquisition of resistance. Therefore, we assessed the combined effect of rifampicin with N-acetylcysteine (NAC) known by its mucolytic effect, in the control of *S. epidermidis* biofilms. Biofilms of 2 *S. epidermidis* strains (9142 and 1457) were treated with 1x minimum inhibitory concentration (4 mg/ml) and 10x minimum inhibitory concentration (40 mg/ml) of NAC and 10 mg/L (peak serum) of rifampicin alone and in combination. NAC at 40 mg/L alone or in combination with rifampicin (10 mg/L) significantly reduced (4 log<sub>10</sub>) the number of biofilm cells. Considering their different modes of action, the association of NAC with rifampicin constitutes a promising therapeutic strategy in the treatment of infections associated to *S. epidermidis* biofilms.

**Anexo D** - *In vitro* activity of daptomycin, linezolid and rifampicin on *Staphylococcus epidermidis* biofilms. **Leite B**, Gomes F, Teixeira P, Souza C, Pizzolitto E, Oliveira R. *Current microbiology*, 63(3):313-7, 2011.

### **Abstract**

Owing to their massive use, *Staphylococcus epidermidis* has recently developed significant resistance to several antibiotics, and became one of the leading causes of hospital-acquired infections. Current antibiotics are typically ineffective in the eradication of bacteria in biofilm associated persistent infections. Accordingly, the paucity of effective treatment against cells in this mode of growth is a key factor that potentiates the need for new agents active in the prevention or eradication of biofilms. Daptomycin and linezolid belong to the novel antibiotic therapies that are active against gram-positive cocci. On the other hand, rifampicin has been shown to be one of the most potent, prevalent antibiotics against *S. epidermidis* biofilms. Therefore, the main aim of this study was to study the susceptibility of *S. epidermidis* biofilm cells to the two newer antimicrobial agents previously mentioned, and compare the results obtained with the antimicrobial effect of rifampicin, widely used in the prevention/treatment of indwelling medical device infections. To this end the *in vitro* activities of daptomycin, linezolid, and rifampicin on *S. epidermidis* biofilms were assessed, using these antibiotics at MIC and peak serum concentrations. The results demonstrated that at MIC concentration, rifampicin was the most effective antibiotic tested. At peak serum concentration, both strains demonstrated similar susceptibility to rifampicin and daptomycin, with colony-forming units (CFUs) reductions of approximately 3-4 log<sub>10</sub>, with a slightly lower response to linezolid, which was also more strain dependent. However, considering all the parameters studied, daptomycin was considered the most effective antibiotic tested, demonstrating an excellent *in vitro* activity against *S. epidermidis* biofilm cells. In conclusion, this antibiotic can be strongly considered as an acceptable therapeutic option for *S. epidermidis* biofilm-associated infections and can represent a potential alternative to rifampicin in serious infections where rifampicin resistance becomes prevalent.

## Anais de Eventos

**Anexo E** - Treatment of *Staphylococcus epidermidis* biofilms associated the osteomyelitis by vancomycin and N-acetylcysteine in combination. **Leite, B.A.**, Gomes, F., Teixeira, P., Souza, C., Oliveira, R., Pizzolitto, E.L.

In: 1<sup>st</sup> Workshop Bone as Engineering Material BEM/ Universidade de São Paulo/USP, São Carlos: 121-125, 2011.

### Abstract

The pathogenesis of foreign body infection, including osteomyelitis, is related to the presence of bacteria in biofilms. *Staphylococcus epidermidis* is the leading cause of infections associated with biofilm formation on indwelling medical devices. Biofilm-related infections are challenging to treat with conventional antimicrobial agents the reduced susceptibility of biofilm bacteria to antimicrobial agents is a crucial problem for treatment of chronic infections. The vancomycin is known to penetrate biofilms and effectively reduce the number of bacteria. N-acetylcysteine (NAC) is a non-antibiotic drug that has antibacterial properties, affects several processes that are important for bacterial biofilm formation, including a drastic reduction in extracellular polysaccharide production. The goal of this study was assess the effect of vancomycin alone and in combination with NAC against biofilm of *S. epidermidis*, in order to obtain a new therapeutic approach. Biofilms of two *S. epidermidis* clinical strains (9142 and 1457 - good biofilm producers) were treated with concentrations MIC (8 mg/l) e peak serum (40 mg/l) of vancomycin alone and in combination with NAC 10xMIC (40 mg/ml). Biofilm susceptibility to agents tested was assessed through, crystal violet (CV) staining that measure total biomass of biofilm and cellular viability through XTT and colony-forming units (CFU/ml). The effect of vancomycin MIC e peak serum alone was similar to that of the control. The use of vancomycin independently of concentration used, combined with NAC showed an effect on biofilm cells promoting CFU reduction of about 3-5 log<sub>10</sub> (p<0.05). The vancomycin-NAC combination decrease the metabolic activity measured by the XTT reduction assay and also loss the total biofilm biomass, assessed by CV staining. In conclusion, this combination (vancomycin-NAC) suggest, an alternative to antibiotics in the treatment of osteomyelitis caused by *S. epidermidis* biofilm.

**Anexo F** - Treatment antimicrobial by vancomycin and N-acetylcysteine in combination on Staphylococci biofilms. **Leite, B.A.**, Gomes, F., Teixeira, P., Oliveira, R., Souza, C., Pizzolitto, E.L.

In: II International Symposium on Drug Discovery/ Universidade Estadual Paulista/UNESP, Araraquara, 2011.

### **Abstract**

The staphylococci are a diverse group of bacteria that cause diseases ranging from minor skin infections to life-threatening bacteremia. The two major opportunistic pathogens of this genus, *S. aureus* and *S. epidermidis*, colonize a sizable portion of the human population. Staphylococci, is the leading cause of infections associated with biofilm formation. Biofilm related infections are challenging to treat with conventional antimicrobial agents. It has been suggested that the decreased antibiotic susceptibility of attached bacteria may result from the glycocalyx providing a barrier that reduces penetration of antibiotics. Vancomycin is known to penetrate biofilms and effectively reduce the numbers of bacteria. N-acetylcysteine (NAC) is a non-antibiotic drug that has antibacterial properties. NAC affects several processes that are important for bacterial biofilm formation, including a drastic reduction in extracellular polysaccharide production, and thus acts as an antibiofilm substance. Accordingly, in the present study, we evaluated the *in vitro* activity of vancomycin alone and in combination with an antimicrobial N-acetylcysteine (NAC) against *S. epidermidis* and *S. aureus* biofilms. Modern medicine is facing the challenge to control the increasing incidence of biofilm infections and this situation has boosted the search of new therapeutic strategies able to evade the intrinsic tolerance of biofilms to antimicrobial agents. The results of viable cells (expressed as  $\log_{10}$  CFU) of two strains of *S. aureus* and two strains of *S. epidermidis*, showed that the use of vancomycin alone in the concentrations MIC, cause no significant effect on the biofilm cells, showed a reduction of about 1-2  $\log_{10}$  in all strains. Antibiotics at concentrations MIC cause no killing effect on the bacteria in biofilm communities. The use combined of vancomycin (MIC) with NAC (10xMIC) consistently decreased the number of viable biofilm, showed a significant effect ( $p < 0.05$ ) on strains evaluated of *S. aureus* and *S. epidermidis*, the reduction promoted was of than 3-5  $\log_{10}$ . In a previous study, reported the effect of the combination NAC-tigecycline on *S. epidermidis* biofilms and showed decrease significant of viable-biofilm with reduction about of 3  $\log_{10}$ . Possible new combinations of antibiotics such as vancomycin showed significantly reduce the subcutaneous tissue infectious caused by staphylococci. The results expressing the decrease in metabolic activity measured by the XTT reduction assay are in very good agreement with those obtained in terms of cell viability. In conclusion, the results of the present study show excellent activity *in vitro* of vancomycin combined with NAC on biofilms. This combination suggests a potential use in the infection caused by biofilm of *S. aureus* and *S. epidermidis*.



**Anexo G** - Effect of N-Acetylcysteine alone and in combination with rifampicin on *Staphylococcus epidermidis* biofilms. **Bruna Leite**, Fernanda Gomes, Pilar Teixeira, Clovis Souza, Elisabeth Pizzolitto, Rosário Oliveira.

In: Biofilms 4 International Conference, Winchester/UK, (276):75-75, 2010.

### **Abstract**

Medical device-associated infections caused by pathogens such as *Staphylococcus epidermidis* might involve biofilm formation and those are particularly challenging. The involvement of antibiotic resistant Staphylococci, exacerbates the problem. Rifampicin cannot be used as a single agent to treat infections because of the rapid selection of resistant mutants. However, combinations of rifampicin with other anti-staphylococcal agents could prevent the emergence of rifampicin resistance during therapy. N-acetylcysteine (NAC) decreases biofilm formation by a variety of bacteria and reduces the production of extracellular polysaccharide matrix. The goal of this study was to assess the antimicrobial activity of NAC in combination with rifampicin against biofilm of *S. epidermidis*. Two *S. epidermidis* strains biofilm-producing (9142 and 1457) were used in this study. 1xMIC (4mg/ml) and 10xMIC (40mg/ml) of NAC and 10mg/l of rifampicin, based on preliminary *in vitro* data, were added to 24h biofilm cells. Biofilm susceptibility to tested antimicrobial agents was assessed through scanning electron microscopy, crystal violet staining (total biofilm biomass) and cellular viability through XTT and colony forming units (CFU). The effect of NAC 1xMIC was similar to that of the control. Rifampicin, NAC 10xMIC alone and NAC-rifampicin combination (independently of NAC concentration used) showed significant bactericidal effect, promoting a 3-4 log<sub>10</sub> decrease in biofilm cells. In conclusion, the results didn't point to any synergistic effect between the two agents. Nevertheless, NAC seems to be a possible alternative to antibiotics in the treatment of infections associated to *S. epidermidis* biofilm.