NATÁLIA HELENA MENDES

**Desenvolvimento de biofilme bacteriano
em superfícies de metais puros**

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Elisabeth Loshchagin Pizzolitto

**São Carlos
2015**

NATÁLIA HELENA MENDES

Desenvolvimento de biofilme bacteriano em superfícies de metais puros

Versão Corrigida

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação
Interunidades em Bioengenharia –
EESC/FMRP/IQSC-USP, como parte dos
requisitos para a obtenção do título de doutor em
Ciências.

Área de Concentração: Bioengenharia

Natália Helena Mendes

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Elisabeth Loshchagin Pizzolitto

**São Carlos
2015**

Programa de Pós-Graduação
Interunidades Bioengenharia
EESC / FMRP / IQSC

Natália Helena Mendes

Título: "Desenvolvimento do biofilme bacteriano em superfícies de metais puros".

TESE APRESENTADA AO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
INTERUNIDADES BIOENGENHARIA - EESC/FMRP/IQSC DA
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO PARA OBTENÇÃO DO TÍTULO DE
DOUTORA EM CIÊNCIAS NA ÁREA DE BIOENGENHARIA.

Aprovada em: ____/____/____

Profa. Dra. Elisabeth Loshchagin Pizzolitto
(Orientadora)

Resultado: Aprovada

Universidade Estadual Paulista – "Júlio de Mesquita
Filho" - UNESP

Assinatura: Elisabeth Loshchagin Pizzolitto

Prof. Dr. Anísio Storti

Resultado: Aprovada

Faculdades Integradas de Fernandópolis - FIFE

Assinatura: Anísio Storti

Prof. Dr. João Manuel Domingos de Almeida
Rollo

Resultado: APROVADO

Escola de Engenharia de São Carlos/USP

Assinatura: João Manuel Domingos de Almeida

Profa. Dra. Raquel Mantuanelli Scarel
Caminaga

Resultado: APROVADA

Universidade Estadual Paulista – "Júlio de Mesquita
Filho" - UNESP

Assinatura: Raquel Mantuanelli Scarel

Profa. Dra. Ticiane Sidorenko de Oliveira
Capote

Resultado: Aprovada

Universidade Estadual Paulista – "Júlio de Mesquita
Filho" - UNESP

Assinatura: Ticiane Sidorenko de Oliveira

Data da homologação: ____/____/____

AUTORIZO A REPRODUÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTA TRABALHO,
POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS
DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

M538d Mendes, Natália Helena
Desenvolvimento do biofilme bacteriano em
superfícies de metais puros / Natália Helena Mendes;
orientadora Elisabeth Loshchagin Pizzolitto. São
Carlos, 2015.

Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação
Interunidades Bioengenharia e Área de Concentração em
Bioengenharia -- Escola de Engenharia de São Carlos;
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto; Instituto de
Química de São Carlos, da Universidade de São Paulo,
2015.

1. Biofilme. 2. Metais puros. 3. Microscopia de
força atômica. 4. Microscopia eletrônica de varredura.
5. Citotoxicidade. I. Título.

DEDICATÓRIA

Ao meu “presentinho de Deus” minha filha Manuela Helena Ruffo, por ser a alegria da minha vida, por me fazer superar as dificuldades com mais garra e por me fazer sentir o maior amor que já poderia ter sentido. Tenho que agradecer muito à Deus por ter me dado a dádiva mais pura e importante do mundo que é o de ser mãe. Te amo mais do que tudo filha!

Agradecimento Especial

À Profª Drª Elisabeth Loshchagin Pizzolitto por sua compreensão, paciência, dedicação, ensinamentos e humildade. Obrigada por acreditar em minha capacidade e por ser uma professora especial para mim.

Agradecimentos

Em primeiro lugar à Deus por estar em todos os momentos da minha vida, por me conduzir aos caminhos corretos e principalmente por me abraçar, me acolher e me amparar nos momentos de fraqueza e cansaço, não me deixando jamais desistir.

Aos meus pais, Antônio Luiz Mendes e Helena Aparecida Ianagoni Mendes, pelo apoio nos momentos mais difíceis, pelo amor incondicional, pelo exemplo a ser seguido e por ser simplesmente a minha vida, a minha razão de viver.

Ao meu marido Thiago Henrique Ruffo por ser meu parceiro, me ajudar nas dificuldades encontradas nessa trajetória, pela compreensão, paciência, dedicação, carinho e amor desses anos que estamos juntos.

Ao meu irmão Alex Luiz Mendes que sempre está sempre ao meu lado, me oferecendo um ombro amigo, uma palavra de consolo e por fim um sorriso para me ajudar a enfrentar todos os obstáculos.

Às minhas fiéis e eternas companheiras Amaitê Belvedere, Mariana Lopes, Debora Pereira pela palavra carinhosa no momento difícil e amizade verdadeira de longos anos.

Às minhas amigas e companheiras de laboratório Gabriela Bettio e Renata Mafré, pelas palavras sinceras, ombro amigo e incentivo em todos os momentos de dificuldade.

Ao meu eterno amigo e irmão Adolfo Barreto por estar ao meu lado em todas as fases da minha vida pessoal e profissional, pelos momentos de tristeza e alegrias que passamos juntos e por me tirar um sorriso mesmo onde tinha uma lágrima.

À minha tia mais que especial Alessandra Macchioni pela paciência, amor, carinho e dedicação.

Ao Dr. João Rollo pela colaboração na parte de metais, incentivo, paciência, ensinamentos, carinho e palavra amiga que sempre esteve à disposição em ajudar.

Ao funcionário, Sebastião Anésio Dametto, pela colaboração e ensinamentos prestados durante a Microscopia eletrônica de varredura, realizada no Instituto de Química – Unesp Araraquara.

Ao funcionário, Marcelo de Assumpção Pereira da Silva, pela colaboração na área de Microscopia de Força Atômica, realizada no Instituto de Física – USP São Carlos.

Ao professor Renato Goulart Jasinevicius pela cumplicidade e ensinamentos realizados durante a Microscopia Óptica.

À professora Ticiania *Sidorenko* de Oliveira Capote pela ajuda, ensinamentos, paciência, cumplicidade e por ter se tornado uma professora que tenho um imenso carinho e respeito.

Aos professores Adilson Bernardi e Juliana Monteiro pela disposição em ensinar, ajudar e escutar sempre que precisei, sendo mais que professores para mim.

Ao Dr. Wagner Maricondi que por várias vezes me compreendeu, ensinou, incentivou e tornou-se uma pessoa que tenho um carinho muito especial.

O ser humano vivencia a si mesmo, seus pensamentos como algo separado do resto do universo - numa espécie de ilusão de ótica de sua consciência. E essa ilusão é uma espécie de prisão que nos restringe a nossos desejos pessoais, conceitos e ao afeto por pessoas mais próximas. Nossa principal tarefa é a de nos livrarmos dessa prisão, ampliando o nosso círculo de compaixão, para que ele abranja todos os seres vivos e toda a natureza em sua beleza. Ninguém conseguirá alcançar completamente esse objetivo, mas lutar pela sua realização já é por si só parte de nossa liberação e o alicerce de nossa segurança interior.

Albert Einstein

RESUMO

MENDES, N. H. **Desenvolvimento de biofilme bacteriano em superfícies de metais puros**. 2015. 88 f. Tese (Doutorado) Programa de Pós-Graduação Interunidades em Bioengenharia EESC/FMRP/IQSC-USP, São Carlos, 2015.

Biofilmes são aglomerados complexos de células microbianas que crescem na superfície de um material sólido, como um metal. As superfícies metálicas são amplamente utilizadas em dispositivos biomédicos cirúrgicos e em superfícies de mobiliário intra-hospitalares as quais podem ser infectadas por bactérias epidemiologicamente importantes e permitir o desenvolvimento de um biofilme. O objetivo desse trabalho foi avaliar a superfície topográfica dos metais puros, incluindo: chumbo, cromo, estanho, ferro e níquel, avaliar a aderência bacteriana nestas superfícies, com a consequente formação de biofilme e a potencial citotoxicidade dos metais por meio de microscopia de força atômica (MFA), microscopia óptica e microscopia eletrônica de varredura (MEV). A metodologia constou de observações microscópicas e procedimentos bacteriológicos. A aderência bacteriana foi verificada por meio de MEV e a viabilidade celular bacteriana por contagem de Unidades Formadoras de Colônia (UFC). A citotoxicidade dos metais foi avaliada frente a células CHO-K1 por ensaio XTT. As bactérias selecionadas foram: *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* (gram-negativos); *Staphylococcus epidermidis* e *Staphylococcus aureus* (gram-positivos) Para realizar o estudo, foram preparados corpos de prova dos metais puros e colocados em contato com cada uma das bactérias (da ordem 10^8 UFC/mL). Os resultados mostraram a formação de biofilme em cada um dos corpos de prova. A contagem das células viáveis demonstrou a recuperação de 10^5 UFC/mL para *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus* após contato com os metais chumbo, cromo, estanho, ferro e níquel, e para *Staphylococcus epidermidis* após contato com chumbo, níquel e cromo houve uma redução bacteriana de 10^3 UFC/mL. Para *Staphylococcus epidermidis* após contato com estanho foram recuperadas $1,14 \times 10^2$ UFC/mL e para o ferro, houve recuperação de $1,3 \times 10^3$ UFC/mL. A MEV demonstrou nestas superfícies metálicas, os bacilos e

cocos aderidos e agrupados em uma massa amorfa formando biofilme. Os resultados da rugosidade (Ra) de cada uma destas superfícies obtidos por MFA em varredura em 2 microns da superfície, mostram que o Ra do chumbo foi de 38.258 μm ; estanho 13.481 μm ; níquel 3.929 μm ; ferro 3.689 μm e cromo 2.097 μm . Os resultados do teste XTT, após contato com as células CHO-K1, mostram que o ferro foi citotóxico para estas células ($p < 0,05$) diferença estatisticamente significativa em relação ao controle negativo. Os metais puros avaliados nas condições experimentais do estudo mostram que as superfícies dos metais puros não impedem a aderência bacteriana e formação de biofilme das bactérias selecionadas.

Palavras chave: Biofilme. Metais puros. Microscopia de força atômica. Microscopia eletrônica de varredura. Citotoxicidade.

ABSTRACT

MENDES, N. H. **Bacterial biofilm development onto pure metals surface. 2015. 88f. Thesis (Doctor).** Programa de Pós-Graduação Interunidades em Bioengenharia EESC/FMRP/IQSC-USP, São Carlos, 2015.

Biofilms are complex microbial cell clusters that are growing on the solid material surface, as a metal. The metallic surfaces are widely used in surgical biomedical devices and hospital furniture surfaces which can be infected by important bacteria and to allow biofilm development. The aim of this work was to evaluate the topographic surface of the lead, chromium, tin, iron and nickel pure metals, evaluate bacterial adhesion in these surfaces with subsequent biofilm formation and the potential cytotoxicity of metals through force microscopy atomic (AFM), optical microscopy and scanning electron microscopy (SEM). The methodology consisted of microscopic observations and bacteriological procedures. Bacterial adherence was observed by SEM and the bacterial cell viability by colony forming units colony counts (CFU). The cytotoxicity of metals was evaluated using CHO-K1 cells by XTT assay. The isolated bacteria were: *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* (gram-negative), and *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus aureus* (gram positive). In order to realize this study, samples of pure metals were prepared and put in touch with each bacteria (in 10^8 CFU/mL). The results show biofilm formation in each of the specimens. The counting of viable cells demonstrated a recovery 10^5 CFU/mL for *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* after contact with lead, chromium, tin, iron and nickel metals and *Staphylococcus epidermidis* after contact with lead, nickel and chromium there was a bacterial reduction of 10^3 CFU/mL. For *Staphylococcus epidermidis* after contact with tin were recovered 1.14×10^2 CFU / mL and the iron, there was a recovery of 1.3×10^3 CFU/mL. The data show that there was a bacterial reduction of 10^3 CFU/mL viable cells. *Staphylococcus epidermidis* on contact with tin were recovered $1,14 \times 10^2$ and the iron recovery was $1,3 \times 10^3$ UFC/mL. SEM showed the metal surfaces, bacilli and

coccus adhered and grouped in an amorphous mass forming biofilm. The results of the roughness (Ra) of each of the surfaces obtained by AFM scan of 2 microns from the surface, show that the RA lead was 38,258 uM; Tin 13,481 uM; Nickel 3,929 uM; iron 3,689 μm and chrome 2,097 μm . The results of XTT, after contact with the CHO-K1 cells, show that iron was cytotoxic to these cells ($p < 0.05$) statistically significant difference compared to the negative control. Pure metals evaluated in the experimental conditions of the study show that the surfaces of pure metals do not prevent bacterial adherence and biofilm formation of the bacteria selected.

Keywords: Biofilm. Pure metals. Atomic force microscopy. Scanning electron microscopy. Cytotoxicity.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - O ciclo de vida do biofilme: A formação de biofilme é um processo de múltiplos estágios que envolvem (1) adesão reversível das células à superfície, (2) secreção de adesinas e EPS resultando na adesão irreversível do biofilme e proliferação celular, (3) formação de microcolônias e maturado do biofilme, e (4) morte celular nas microcolônias e desprendimento das células que retornam para um a fase planctônica, completando o ciclo de vida do biofilme (REHM, 2008).	24
Figura 2: Rugosidade média (Ra)	31
Figura 3: Rugosidade média quadrática (Rms)	31
Figura 4: Corpo-de-prova do metal Chumbo	35
Figura 5: Corpo-de-prova do metal Estanho	35
Figura 6: Corpo-de-prova do metal Níquel	35
Figura 7: Corpo-de-prova do metal Cromo	36
Figura 8: Corpo-de-prova do metal Ferro	36
Figura 9: Microscópio óptico Veeco	38
Figura 10: Placa de cultura com os metais chumbo, estanho e níquel.	39
Figura 11: Placa de cultura com os metais chumbo, estanho e níquel com a suspensão bacteriana.	40
Figura 12: Método da diluição seriada para quantificar células viáveis	41
Figura 13: Placas de TSA incubadas em estufa a 37°C durante 24 horas	42
Figura 14: Rugosidade do metal puro chumbo em 10µm	46
Figura 15: Análise da rugosidade do metal puro chumbo em 10µm	46
Figura 16: Rugosidade do metal puro chumbo em 10µm	47
Figura 17: Rugosidade do metal puro estanho em 10µm	47
Figura 18: Análise da rugosidade do metal puro estanho 10µm	48
Figura 19: Rugosidade do metal puro estanho em 10µm	48
Figura 20: Rugosidade do metal puro cromo 10µm	49
Figura 21: Análise da rugosidade metal puro cromo 10µm	49
Figura 22: Rugosidade do metal puro cromo 10µm	50

Figura 23: Rugosidade do metal puro ferro em 10µm	50
Figura 24: Análise da Rugosidade do metal puro ferro em 10µm	51
Figura 25: Rugosidade do metal puro ferro em 10µm	51
Figura 26: Rugosidade do metal puro níquel em 10µm	52
Figura 27: Análise da rugosidade do metal puro níquel em 10µm	52
Figura 28: Rugosidade do metal puro níquel 10µm	53
Figura 29: Metal chumbo 2.5x	54
Figura 30: Metal chumbo 25x	55
Figura 31: Metal chumbo 100x	55
Figura 32: Metal estanho 2.5x	56
Figura 33: Metal estanho 25x	56
Figura 34: Metal estanho 100x	57
Figura 35: Metal cromo 2.5x	57
Figura 36: Metal cromo 25x	58
Figura 37: Metal cromo 100x	58
Figura 38: Metal ferro 2.5x	59
Figura 39: Metal ferro 25x	59
Figura 40: Metal ferro 100x	60
Figura 41: Metal níquel 2.5x	60
Figura 42: Metal níquel 25x	61
Figura 43: Metal níquel 100x	61
Figura 44: Crescimento do <i>S. aureus</i> no metal chumbo	62
Figura 45: Crescimento do <i>S. epidermidis</i> no metal ferro	63
Figura 46: Crescimento do <i>S. epidermidis</i> no metal estanho	63
Figura 47: Crescimento do <i>P. aeruginosa</i> no metal estanho	64
Figura 48: Crescimento do <i>E. coli</i> no metal chumbo	64
Figura 49: Biofilme de <i>Escherichia coli</i> no metal ferro - 5.000x	65
Figura 50: Biofilme de <i>E. coli</i> no metal cromo no aumento de 3.000x	66
Figura 51: Biofilme de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> no metal chumbo - 2.000x	66
Figura 52: Biofilme do <i>Staphylococcus aureus</i> no metal chumbo - 5.000x	67

Figura 53: Biofilme do *Staphylococcus epidermidis* no metal cromo - 3.000x 67

Figura 54: Biofilme do *Staphylococcus epidermidis* no metal estanho 5.000x 68

Figura 55: Ensaio XTT para avaliação da viabilidade celular. Quarto dia: 69
placa de 24 poços contendo meio DMEN sem fenol vermelho com solução
XTT/eléctron após 3 horas. Poços com cor laranja mais forte
correspondem à maior conversão de tetrazólico em formazan por células
metabolicamente ativas.

Figura 56: Ensaio XTT. As colunas indicam o valor médio de viabilidade 69
celular (%) para os metais estudados. Barras indicam o erro padrão. ***
indica diferença estatisticamente significativa em relação ao controle
negativo ($p < 0,0001$). Teste de Dunnett.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Rugosidade média quadrática dos metais chumbo, estanho, cromo, ferro e níquel pela Microscopia de Força Atômica em nanômetro (nm).	45
Tabela 2: Rugosidade dos metais chumbo, estanho, cromo, ferro e níquel pela Microscopia de Força Atômica em nanômetro (nm).	45
Tabela 3: Rugosidade média quadrática dos metais chumbo, estanho, cromo, ferro e níquel pela Microscopia Óptica em nanômetro (nm).	53
Tabela 4: Rugosidade média dos metais chumbo, estanho, cromo, ferro e níquel pela Microscopia Óptica em nanômetro (nm).	54
Tabela 5: Crescimento bacteriano da diluição 10^{-5} dos metais.	62
Tabela 6: Cepa de Campo 1 - Bactéria: <i>Staphylococcus epidermidis</i>	85
Tabela 7: Cepa de Campo 2 - Bactéria: <i>Staphylococcus aureus</i>	86
Tabela 8: Cepa de Campo 3 - Bactéria: <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	87
Tabela 9: Cepa de Campo 4 - Bactéria: <i>Escherichia coli</i>	88

SUMÁRIO

1 – INTRODUÇÃO	20
2 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	22
3 – OBJETIVOS	33
3.1 – Objetivos Gerais	33
3.2 – Objetivos Específico	33
4 - MATERIAIS E MÉTODOS	34
4.1 – Materiais	34
4.1.1 - Confeção dos Corpos-de-prova	34
4.1.2 – Bactérias selecionadas	36
4.2 – Métodos	37
4.2.1 - Caracterização da Superfície	37
4.2.2.1 - Microscopia de Força Atômica	37
4.2.2.2 - Microscopia Óptica	37
4.2.3.1 - Preparo dos Corpos para análise microbiológica	38
4.2.3.2 - Preparação do Inóculo	38
4.2.3.3- Formação do Biofilme Bacteriano	39
4.2.3.4 - Preparo da diluição seriada para quantificar as células viáveis	40
4.2.3.5 – Contagem das células viáveis - Método da Gota	41
4.2.4 - Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	42
4.2.5 – Ensaio de Citotoxicidade	42
4.2.5.1 – Esterilização dos Corpos-de-prova	42
4.2.5.2 - Preparo do Eluato	43
4.2.5.3 - Cultura Celular e Tratamentos	43
4.2.5.4 - Kit-XTT (Roche Molecular Biochemicals)	43
4.2.5.5 - Análise estatística	44
5 – RESULTADOS	45
5.1 - Caracterização da Superfície	45
5.1.1 - Microscopia de Força Atômica	45
5.1.2 - Microscopia Óptica	53

5.2 - Formação do Biofilme Bacteriano	62
5.2.1 - Espalhamento em Placa (Plaques em Superfície)	62
5.3 – Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	65
5.4 – Ensaio de Citotoxicidade – XTT	68
6 – DISCUSSÃO	71
7 – CONCLUSÃO	77
8 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	78
9 – ANEXOS	83
9.1 – Meios de Cultura e Soluções	83
9.1.1 - Caldo Soja Trípica (Tryptic Soy Broth – TSB)	83
9.1.2 - Soja Trípica (Tryptic Soy Ágar – TSA)	83
9.1.3 – Reagentes utilizados no preparo dos corpos-de-prova para análise por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	83
Tabela 6: Cepa de Campo 1 - Bactéria: <i>Staphylococcus epidermidis</i>	85
Tabela 7: Cepa de Campo 2 - Bactéria: <i>Staphylococcus aureus</i>	86
Tabela 8: Cepa de Campo 3 - Bactéria: <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	87
Tabela 9: Cepa de Campo 4 - Bactéria: <i>Escherichia coli</i>	88

1 - INTRODUÇÃO

Os biofilmes são depósitos onde os micro-organismos estão fortemente aderidos a uma superfície por meio de filamentos de natureza protéica ou polissacarídica, denominados glicocálix. Existem vários fatores relacionados à formação de biofilmes, dentre os quais destacam-se as características físico-químicas do material sobre o qual estão aderidos e expressão de fatores de virulência por parte dos micro-organismos, como a produção de cápsula exopolimérica e fímbrias (DOROBANTU *et al.*, 2012).

A maioria das superfícies microbianas são estruturalmente muito complexas enfatizando um envelope celular bem definido, que consiste numa membrana citoplasmática, parede celular, muitas vezes, uma camada exterior de polissacarídeo e várias estruturas superficiais (DOROBANTU *et al.*, 2012).

Metais são substâncias com elevada condutividade elétrica, maleabilidade e brilho, que voluntariamente perdem seus elétrons para formar cátions. Metais são encontrados naturalmente na crosta terrestre e suas composições variam entre as diferentes localidades, resultando em variações espaciais relativas às suas concentrações. A distribuição dos metais na atmosfera é acompanhada pelas propriedades do metal e vários fatores ambientais (JAISHANKAR *et al.*, 2014).

Metais pesados são geralmente referidos como os metais que possuem uma densidade específica de mais de 5g/cm^3 e ocasionalmente afetam o meio ambiente e os organismos vivos. Estes metais quando em concentrações muito baixas, são importantes para manter diversas funções bioquímicas e fisiológicas em organismos vivos, no entanto, tornam-se nocivos quando excedem certos limiares de concentração (JAISHANKAR *et al.*, 2014).

Heterogeneidade de superfície bacteriana é uma característica fundamental no mundo microbiano e esta heterogeneidade é utilizada para estudar funções celulares importantes. A fim de caracterizar as interações microbianas com diversas superfícies e interfaces, é necessário descobrir suas propriedades morfológicas e características físico-químicas. Os métodos tradicionais microscópicos utilizados para determinar morfologia da superfície microbiana exigem extensa preparação das

amostras que podem danificar a superfície da célula e produzir artefato (DOROBANTU *et al.*, 2012).

Como resultado, a necessidade de técnicas mais sofisticadas era evidente e pesquisadores começaram a ter suas perguntas respondidas com sucesso por meio da descoberta da microscopia de força atômica. O microscópio de força atômica (AFM) é um poderoso instrumento para investigação microbiológica. Ele tem evoluído a partir de uma ferramenta de imagem utilizada para investigar superfícies microbianas em alta resolução, fornecendo imagens de alta resolução topográfica, bem como informação quantitativa sobre força de superfície e elasticidade. Isto pode conduzir a uma melhor compreensão do mecanismo de formação de biofilme (DOROBANTU *et al.*, 2012).

AFM também pode ser utilizada para verificar a rugosidade de superfícies metálicas. Incluindo os metais puros. A rugosidade é o conjunto de irregularidades, isto é, pequenas saliências e reentrâncias de uma superfície e desempenham um papel importante no comportamento dos micro-sistemas, afetando tanto o desempenho como a eficiência desses dispositivos (DOROBANTU *et al.*, 2012).

Outras microscopias também podem ser usadas para investigação microbiológica sobre superfícies, como por exemplo, a microscopia eletrônica de varredura é indicada para a avaliação topográfica de superfícies metálicas e da interação microbiana do biofilme com a superfície metálica. As características topográficas dos materiais podem ser conhecidas por meio de microscopia eletrônica de varredura. Amostras biológicas devem ser fixadas e metalizadas para avaliar a interação bactéria/superfície metálica (PIZZOLITTO, 1997).

Outra tecnologia que pode ser usada para estudar a superfície de metais é a microscopia óptica, microscópio Wyko NT1100, fornece medidas tridimensionais da superfície, sem contato com o material analisado.

Além das microscopias avançadas, as culturas bacteriológicas podem ser usadas para avaliar a interação bactérias / superfícies metálicas. E a partir desse conhecimento, essa pesquisa foi idealizada para investigar-se o comportamento de bactérias de importância hospitalar frente a metais puros, incluindo chumbo, estanho, níquel, cromo e ferro.

2 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Algumas espécies de estafilococos coagulase negativo produzem um muco ou *slime* (polissacarídeo extracelular) que permite a bactéria aderir às superfícies, sendo importante para a colonização. A produção de *slime* é considerada um fator de virulência, facilitando a aderência e a formação do biofilme. A adesão microbiana ocorre devido à deposição de micro-organismos em uma superfície de contato onde se fixam e iniciam o seu desenvolvimento. Essa multiplicação celular dá origem a colônias e quando a massa celular é suficiente para agregar nutrientes, resíduos e outros micro-organismos, estabelece-se o biofilme (BERNARDI *et al.*, 2007).

Toda superfície de um material entra em contato com fluidos biológicos do hospedeiro, primeiramente com proteínas do soro e plaquetas. A albumina, como o maior constituinte do soro, é rapidamente depositada no material “estranho” e impede a ativação não específica do neutrófilo e a deposição da matriz protéica na superfície (DAHINDEN *et al.*, 1983).

Biofilmes são aglomerados complexos de células microbianas que crescem na superfície de um material sólido. O crescimento do biofilme ocorre em superfícies, bem como nos sistemas naturais, industriais e até mesmo sobre os tecidos de um hospedeiro. A adesão de uma única célula bacteriana em superfícies é mediada por relações complexas, entre interações específicas e inespecíficas (HARIMAWAN *et al.*, 2011). O desenvolvimento de biofilme através de multicamadas bacterianas é unido por uma matriz de polissacarídeo, e essa estrutura impede a ação de células fagocitárias do sistema imune e agente antimicrobianos (GOMES *et al.*, 2009).

A formação do biofilme é uma estratégia de sobrevivência dos micro-organismos em um ambiente com condições adversas o que provoca uma alteração fenotípica de células planctônicas (vida livre) para a forma sésil (aderidas) (BERNARDI *et al.*, 2007).

Existem várias teorias propostas para formação de biofilmes. A primeira teoria foi descrita por MARSHALL, *et al.* (1971) e ressalta que a adesão é um processo que ocorre em duas fases. Na primeira fase, o processo é ainda reversível, em função do processo de adesão do micro-organismo na superfície ocorrer por forças

de Van der Waals e atração eletrostática. Na segunda etapa, ocorre a interação física da célula com a superfície por meio de material extracelular de natureza polissacarídea ou protéica produzida pela bactéria, que é denominada matriz de glicocálix, que suporta a formação de biofilmes. O glicocálix é produzido após o processo de adesão superficial e vai fornecer condições de adesão do peptidoglicano das bactérias Gram positivas e a parte externa da membrana externa das Gram negativas (KASNOWSKI *et al.*, 2010).

Outra teoria sugere para a formação de biofilmes, cinco etapas que didaticamente podem ser colocadas na seguinte ordem: I) condicionamento da superfície pela adsorção de material orgânico; II) transporte de células e nutrientes para o sítio de aderência; III) inicia-se o processo de adesão bacteriana, ainda reversível, por atração eletrostática; IV) crescimento celular, colonização e adesão irreversível; e V) o biofilme apresenta alta atividade metabólica com liberação de células localizadas na periferia (KASNOWSKI *et al.*, 2010).

Interações inespecíficas, tais como eletrostática, hidrofóbicas e forças de van der Waals, estão associadas com propriedades físico-químicas das células e da superfície. Por outro lado, as interações específicas, implicam em um reconhecimento específico, como a interação de moléculas de proteínas que se ligam nas superfícies. Estruturas de superfície como fímbrias, flagelos e as cápsulas são acreditados estar envolvido na adesão bacteriana aos diferentes tipos de superfícies. A presença e as propriedades dessas células constituintes de superfície dependem da natureza das espécies bacterianas e as condições de crescimento (HARIMAWAN *et al.*, 2011).

A figura a seguir demonstra o esquema didático da formação de biofilme bacteriano sobre uma superfície abiótica:

Figura 1 - O ciclo de vida do biofilme: A formação de biofilme é um processo de múltiplos estágios que envolvem (1) adesão reversível das células à superfície, (2) secreção de adesinas e EPS resultando na adesão irreversível do biofilme e proliferação celular, (3) formação de microcolônias e maturado do biofilme, e (4) morte celular nas microcolônias e desprendimento das células que retornam para um a fase planctônica, completando o ciclo de vida do biofilme (REHM, 2008).

A bactéria tem diversas vantagens quando reside dentro de um biofilme: apresentam certo grau de proteção contra biocidas, antibióticos, anticorpos, surfactantes, bacteriófagos e organismos predadores; este microambiente permite o fornecimento de nutrientes do meio para algumas cepas e transmissão de elementos genéticos das diferentes espécies bacterianas envolvidas no biofilme pelo contato direto entre estas bactérias (DUNNEY, 2002).

Os micro-organismos são amplamente difundidos em vários ambientes onde eles podem ser benéficos, como em bioprocessamento ou prejudiciais, como na indústria de alimentos e remédios onde eles podem causar a contaminação do produto (DOROBANTU *et al.*, 2012).

A contaminação de origem biológica sobre superfícies pode incluir os biofilmes, sangue, proteínas, entre outros. A adesão bacteriana em superfícies é uma condição prévia para a formação de biofilmes (FANG *et al.*, 1999; LIU & ZHAO, 2005).

Biofilmes tem um impacto enorme na saúde e estima-se estar associado a 65% de infecções nosocomiais e contribuem mais de 80% das infecções em humanos (HANCOCK *et al.*, 2010). Há uma necessidade intensa de erradicar a contaminação das superfícies, equipamentos médicos e encontrar estratégias para contribuir para o controle da infecção hospitalar (SMITH & HUNTER, 2008).

Além disso, os implantes médicos estão propensos à colonização e formação de biofilme por bactérias patogênicas, servindo com fonte para infecções recorrentes (HANCOCK *et al.*, 2010).

As infecções nosocomiais (hospitalares), representam um sério problema de Saúde Pública, estando entre as principais causas de morbidade e mortalidade, aumentando o tempo de hospitalização dos pacientes e, conseqüentemente, os custos do tratamento. Durante a última década houve um aumento alarmante no número de infecções hospitalares por micro-organismos multi-drogas resistentes (SMITH & HUNTER, 2008).

As bactérias que compõem estas comunidades microbianas são protegidas de forma que se tornam recalcitrantes tanto para o sistema imune como para os antibióticos, e desempenham papel importante na disseminação da resistência aos antibióticos (COSTERTON *et al.*, 2005).

O uso de materiais antibacterianos tornou-se significativo em hospitais ajudando a reduzir as infecções nosocomiais. A prevenção de bactérias aderidas a superfícies de materiais é o melhor método para diminuir os problemas relacionados à infecção hospitalar (YASUYUKI *et al.*, 2010).

A rugosidade do substrato é outra propriedade importante envolvida no fenômeno de adesão bacteriana. As irregularidades aumentam a área de superfície, e promovem um maior favorecimento e surgimento de sítios adicionais para colonização bacteriana, tal como rachaduras que protegem as células bacterianas da ação do sistema imune do hospedeiro (SCHEUERMAN *et al.*, 1998)

Os metais pesados causam muitos efeitos adversos para a saúde e possuem um longo período de duração. A exposição contínua do organismo a um metal pesado continua tende a aumentar em muitas partes do mundo. Os metais pesados são significativos poluentes ambientais e a sua toxicidade é um problema importante

ecologicamente, principalmente por razões nutricionais e ambientais. Os metais pesados mais comumente encontrados em águas residuais incluem arsênio, cádmio, cromo, cobre, chumbo, níquel e zinco, os quais causam riscos para a saúde humana e o ambiente. Diversas são as fontes encontradas de metais pesados, como a erosão do solo, desgaste natural da crosta terrestre, mineração, efluentes industriais, urbanos, escoamento, lançamento de efluentes e muitos outros (JAISHANKAR *et al.*, 2014).

Como aspecto positivo os metais pesados possuem funções biológicas cruciais para plantas e animais. Algumas vezes suas propriedades químicas e oxidação-redução têm atribuído um benefício adicional para esses organismos, de maneira que eles podem escapar de mecanismos de controle, como a homeostase. Por outro lado, estes metais ligam-se as proteínas, causando o mau funcionamento celular e toxicidade (JAISHANKAR *et al.*, 2014).

O metal cromo é o sétimo elemento mais abundante da terra, considerado altamente tóxico para seres humanos, animais e plantas, sendo liberado para o meio ambiente na forma de esgoto e fertilizantes. Para determinar as atividades dos íons metálicos no ambiente, a especificação do metal é muito importante, onde o Cr (VI) é tóxico para os humanos. O cromo é amplamente utilizado em indústrias como na metalurgia, na produção de tintas e pigmentos, preservação de madeira, produção de substâncias químicas e produção de celulose e papel. Com a grande demanda de práticas industriais e agrícolas, o nível tóxico do metal cromo aumenta a poluição e a preocupação ambiental (JAISHANKAR *et al.*, 2014).

O ferro é o segundo metal mais abundante na crosta terrestre e é o elemento mais importante para o crescimento e sobrevivência de quase todos os organismos vivos. É um dos componentes vitais para organismos como algas e para ação de enzimas, tais como os citocromos e catalase, bem como proteínas de transporte de oxigênio, como hemoglobina e mioglobina. O ferro é um metal de transição atraente para vários processos biológicos de redução, devido à sua inter-conversão entre ferroso (Fe^{2+}) e férrico (Fe^{3+}) (JAISHANKAR *et al.*, 2014).

Os metais prata, cobre e chumbo são conhecidos por serem tóxicos para diversas espécies bacterianas, sendo que chumbo e estanho são considerados

tóxicos para os seres humanos. Devido às propriedades antibacterianas destes metais, eles têm sido utilizados para fazer aços inoxidáveis antibacterianos (YASUYUKI *et al.*, 2010).

Infecções agudas podem ser tratadas eficazmente com antibióticos, exceto casos de infecção por uma bactéria resistente a determinado antibiótico. No entanto, mais da metade das doenças infecciosas que afetam indivíduos imunocomprometidos envolvem espécies bacterianas que estão amplamente distribuídos na natureza e fazem parte da microbiota normal de pele e mucosas de mamíferos e aves, como a bactéria *Staphylococcus aureus*; também bactérias que são comuns no ambiente, por exemplo, a bactéria aquática *Pseudomonas aeruginosa*. Essas bactérias podem causar infecções crônicas tornando-se multiresistentes em indivíduos imunocomprometidos e hospitalizados (COSTERTON *et al.*, 2005).

Esses dois micro-organismos são de interesse particular na área da saúde. O *Staphylococcus aureus* é uma das principais causas de bacteremia nosocomiais e outras infecções como em feridas e relacionadas a cateteres, implantes protéticos e pneumonia (SMITH & HUNTER, 2008). *Staphylococcus aureus* MRSA (*Staphylococcus aureus* metilina resistente) e *Pseudomonas aeruginosa* são frequentemente isolados de superfícies hospitalares, incluindo estetoscópios, cateteres e até dispensadores de sabão desinfetantes (SMITH & HUNTER, 2008).

Os estafilococos foram considerados por longo tempo como contaminantes inofensivos e recentemente emergiram como capazes de causar várias infecções humanas, que frequentemente conduzem a uma infecção persistente, principalmente após cirurgia de implantes e também, são responsáveis por causarem doenças em pacientes imunocomprometidos (BERNARDI *et al.*, 2007).

Os *Staphylococcus aureus* metilina resistentes (MRSA) são bactérias resistentes a todos os beta-lactâmicos e responsáveis por infecções hospitalares principalmente relacionadas às feridas. Apesar da cepa MRSA permanecer viável em uma série de superfícies e objetos, facilitando a transferência para as pessoas no ambiente hospitalar. Noyce *et al.* (2006), viram que materiais como maçaneta de

porta deveria ser revestida com cobre ou desinfetados todos os dias evitando a propagação dos contaminantes.

A bactéria *Staphylococcus epidermidis* faz parte da microbiota da pele e membranas mucosas de humano (LEITE *et al.*, 2011). Atualmente, *Staphylococcus epidermidis* e outros estafilococos coagulase negativos (ECN) são considerados como importantes patógenos associados a infecções nosocomiais, podendo ser considerado um patógeno oportunista. Essa bactéria tornou-se a principal causa de bacteremia nosocomial, também sendo encontrada em infecções no olho, nariz, garganta e infecções cardiovasculares (GOMES *et al.*, 2009). Além disso, os ECN estão relacionados à capacidade do micro-organismo aderir a superfícies e formar biofilmes. A formação de biofilmes tem sido considerada o principal mecanismo de virulência do *S. epidermidis* e a principal causa de infecções crônicas (GOMES *et al.*, 2009).

O grupo de *Staphylococcus* coagulase negativos (ECN), além da sistemática quanto à microbiota ou infecção, isolados hospitalares, são frequentemente resistentes à oxacilina, e isso indica resistência cruzada com todas as classes de antimicrobianos β -lactâmicos incluindo as cefalosporinas. Além disso, ECN resistente à oxacilina está em grande parte relacionada com resistência a outros antimicrobianos, particularmente os aminoglicosídeos e macrolídeos (CORAÇA-HUBER *et al.*, 2012).

Um biofilme formado pelo *Staphylococcus epidermidis* é mais resistente a ataques do sistema imunológico e tratamentos com antibióticos. Cepas de *Staphylococcus epidermidis* adquiriram resistência a vários antibióticos, incluindo meticilina, rifampicina, fluoroquinolonas, gentamicina, tetraciclina, cloranfenicol, eritromicina, clindamicina e sulfonamidas (HU *et al.*, 2010).

A formação de biofilme pelo *Staphylococcus epidermidis* pode ser dividido em duas fases: a adesão primária rápida de estafilococos na superfície ou a proliferação de células bacterianas no tecido hospedeiro seguido por formação do biofilme. Na etapa inicial de adesão bacteriana a ligação de células abióticas é mediada por diferentes interações, força de van der Waals, forças eletrostáticas e hidrofobicidade de superfície. Além disso, a adesão inicial bacteriana é provavelmente mediada pela

formação de uma primeira camada condicionante, composta por macromoléculas (peptídeos, proteínas, EPS – substância polimérica extracelular) na superfície abiótica. Essa etapa entre adesão bacteriana às células de superfície é o passo essencial para a formação de biofilme (HU *et al.*, 2010).

A *Pseudomonas aeruginosa* é uma bactéria amplamente ubiqüitária e tornou-se um importante patógeno oportunista entre os pacientes imunocomprometidos em terapias intensivas, unidades neonatais e queimaduras, sendo a principal causa de infecção crônica, podendo causar danos pulmonares em pacientes com fibrose cística (SMITH & HUNTER, 2008).

Estudos relatam que a aderência de *Pseudomonas aeruginosa*, patógeno ubíquo, é responsável por formação de biofilme e aderência sobre superfícies como aço inoxidável (AUDETTE *et al.*, 2007; COSTERTON *et al.*, 1999; FANG *et al.*, 1999). Substância polimérica extracelular (EPS) secretada pela bactéria e os flagelos bacterianos também desempenham um papel importante na adesão e formação subsequente do biofilme (FANG *et al.*, 1999).

A consequência mais importante da formação do biofilme é a resistência aos agentes antimicrobianos, criando uma necessidade de desenvolvimento de novas drogas. Por isso, o tratamento de infecções associadas ao biofilme é difícil, elevado e em casos severos requer métodos cirúrgicos ou remoção do implante, sendo neste caso desejável uma alternativa de prevenção custo-benefício (YU *et al.*, 2010).

A microscopia eletrônica é indicada para a avaliação da interação microbiana do biofilme. As pesquisas sobre biomateriais vêm aumentando rapidamente. As características topográficas dos biomateriais podem ser conhecidas por meio de microscopia eletrônica de varredura. A fixação das amostras é mais indicada para a avaliação da interação microbiana na matriz do biofilme (PIZZOLITTO, 1997).

Binnig, Quate e Gerber desenvolveram em 1986, o microscópio de força atômica (“Atomic Force Microscopy” - AFM), também conhecido como SFM (“Scanning Force Microscopy”), que pode produzir imagens de superfícies não condutoras e condutoras (FERREIRA & HIDEKO, 2006). A invenção do microscópio de força atômica (AFM) é reconhecido como um dos marcos da ciência moderna

(DOROBANTU *et al.*, 2012). A microscopia de força atômica (AFM) é uma ferramenta poderosa para estudar as forças de adesão de superfície de uma única célula bacteriana, na interface célula-célula e na periferia da superfície de contato do substrato celular (FERREIRA & HIDEKO, 2006). Harimawan e colaboradores (2011) demonstraram ainda mais a viabilidade do uso da AFM para a análise da formação de biofilmes em superfícies metálicas.

O princípio de funcionamento do AFM baseia-se na varredura da superfície da amostra por uma ponta piramidal (ponteira) de alguns micra de comprimento (100 a 200 μm) e geralmente com menos de vinte nanômetros de diâmetro, integrada em um cantilever flexível. A sonda (ponteira + cantilever) é sempre o componente básico da AFM e, para alcançar resolução atômica, a ponta tem que terminar em um conjunto de átomos (FERREIRA & HIDEKO, 2006). O resultado da interação entre a amostra e a ponta é detectada pelo sistema óptico de deflexão. Um feixe de laser é refletido atrás do cantilever e coletados em um fotodetector, registrando a posição refletida da viga. O sinal é processado digitalmente para construir uma imagem topográfica (DOROBANTU *et al.*, 2012).

A AFM é composta de quatro componentes principais: uma ponta do AFM, um *scanner* pizoelétrico, um sistema de deflexão óptica (laser diodo e fotodetector) e um sistema de retorno elétrico. O componente principal da AFM é a ponta de sondagem (prob), localizado na extremidade de um braço de suporte flexível, que geralmente é de silício ou nitrato de silício. A amostra é montada no scanner pizoelétrico que move precisamente em três dimensões, permitindo o posicionamento 3D em alta resolução (DOROBANTU *et al.*, 2012).

A AFM surgiu como um complemento importante para as técnicas microscópicas e macroscópicas existentes, devido às vantagens em relação à preparação de amostras e capacidade para imagiologia com resolução maior que as técnicas de microscopia de luz padrão. Nas últimas duas décadas, a AFM teve um avanço na técnica em relação à facilidade de preparar a amostra e instrumentação, revolucionando a forma que os cientistas exploram as superfícies bacterianas (DOROBANTU *et al.*, 2012).

Além de fornecer imagens de alta resolução topográficas, a AFM fornece informações quantitativas sobre a força de superfície. Isso pode levar a uma melhor compreensão do mecanismo de formação de biofilme (FANG *et al.*, 1999).

No presente estudo, a AFM foi utilizada para verificar a rugosidade de metais puros. A rugosidade é o conjunto de irregularidades, isto é, pequenas saliências e reentrâncias de uma superfície e desempenham um papel importante no comportamento dos micro-sistemas, afetando tanto o desempenho como a eficiência desses dispositivos.

Na AFM é possível avaliar a rugosidade média (R_a), exemplificada na figura 2, onde a soma das áreas cheias acima da linha horizontal é igual à soma das áreas vazias abaixo (considerando a superfície sem ondulação).

Figura 2: Rugosidade média (R_a)

A rugosidade média é o método mais usado para indicar a rugosidade, porém não é tudo. Os perfis da figura 2 apresentam o mesmo valor de R_a , mas é possível observar a diferença da estrutura do desenho. Parâmetros como picos, depressões, formas, espaçamentos devem ser considerados. A rugosidade média quadrática é usada apenas para superfícies de sistemas óticos exemplificada na figura 3.

Figura 3: Rugosidade média quadrática (R_{ms})

Padilha (1997) relata que por modificação da textura cristalográfica (distribuição de orientações dos grãos que compõe a microestrutura do material) dos

metais pode se modificar suas propriedades mecânicas, elétricas, magnéticas e de resistência ao desgaste e à corrosão.

Outra tecnologia utilizada para estudar a superfície de metais é a microscopia óptica realizada pelo microscópio Wyko NT1100, que fornece medidas tridimensionais da superfície, sem contato com o material analisado.

3 – OBJETIVOS

3.1 – Objetivos Gerais

Avaliar a superfície topográfica dos metais chumbo, cromo, estanho, ferro e níquel, por meio de microscopia de força atômica e microscopia óptica, a aderência bacteriana através da microscopia eletrônica de varredura e avaliar a citotoxicidade desses metais.

3.2 – Objetivos Específicos

Analisar a superfície dos metais chumbo, estanho, níquel, cromo, ferro por microscopia de força atômica e microscopia óptica.

Avaliar através da microscopia eletrônica de varredura a aderência bacteriana e/ou a formação de biofilme das bactérias: *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus epidermidis* e *Staphylococcus aureus*, nas superfícies dos metais puros selecionados.

Avaliar a citotoxicidade dos metais chumbo, estanho, níquel, cromo, ferro por meio de XTT.

4- MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 – MATERIAIS

4.1.1 - Confecção dos Corpos-de-prova

Os corpos de prova dos metais chumbo, estanho, níquel, cromo, ferro foram preparados no Laboratório de Mecânica da Unidade de Biomateriais da Universidade de São Paulo (USP), localizada em São Carlos - S.P.

Para realizar a técnica microbiológica e a microscopia óptica foram confeccionados os metais puros chumbo e estanho na forma de cubo apresentando dimensão de 10 mm x 10 mm de diâmetro por 0,5 mm de espessura (Figura 4 e 5) e os metais níquel, cromo e ferro na forma de cubo apresentaram dimensão de 10 mm x 10 mm de diâmetro por 0,3 mm de espessura (Figura 6, 7 e 8). Essa diferença na espessura dos metais puros é devido à composição química de cada metal.

Para a avaliação da rugosidade superficial dos corpos-de-prova por meio do microscópio de força atômica (AFM) os metais foram confeccionados com dimensão 0,5 mm x 0,5 mm e espessura de 0,2 nanômetros, seguindo as especificações do equipamento.

Após a confecção dos metais puros chumbo, cromo, estanho, ferro e níquel na forma de cubos, esses foram lixados com lixa da marca Merch de 220, 320, 400, 500, 600, 800, 1200 e 2000 sucessivamente. Em seguida, foi realizado um polimento com pasta de diamante de 1 micron com o equipamento politrís metalográfica motorizada Aropol ED (Arotec).

A composição química dos metais analisados foi superior a 98% de pureza.

Figura 4: Corpo-de-prova do metal Chumbo

Figura 5: Corpo-de-prova do metal Estanho

Figura 6: Corpo-de-prova do metal Níquel

Figura 7: Corpo-de-prova do metal Cromo

Figura 8: Corpo-de-prova do metal Ferro

4.1.2 – Bactérias selecionadas

As bactérias selecionadas, *Escherichia coli* (ESBL), *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus epidermidis* e *Staphylococcus aureus* metilina resistentes (MRSA), para este estudo foram provenientes de culturas de sangue de pacientes hospitalizados. Foram identificadas no equipamento automatizado Walkaway 96 (Siemens) que segue os procedimentos operacionais definidos em documento da Clinical and Laboratory Standards Institute - CLSI (2012). O perfil de sensibilidade/resistência foi realizado no mesmo equipamento, o qual realiza a identificação bacteriana com 99,9% de confiabilidade e determina a Concentração

Inibitória Mínima (CIM) dos antibióticos, seguindo os pontos cortes estabelecidos pela CLSI (2012).

As bactérias selecionadas são de origem hospitalar, recuperadas de cultura de sangue e escolhidas de acordo com o perfil de resistência frente a antibióticos, resistentes a mais de 3 drogas, consideradas MDR. O perfil de sensibilidade das bactérias selecionadas está anexo na página 79.

A *Escherichia coli* selecionada é uma cepa com Beta-lactamase de espectro ampliado (ESBL), que são enzimas que inativam as penicilinas, as cefalosporinas e os monobactâmicos. Apresentam sensibilidade *in vitro* às cefamicinas e carbapenems estáveis a betalactamases (ertapenem, imipenem e meropenem).

4.2 – MÉTODOS

4.2.1 - Caracterização da Superfície

A caracterização das superfícies dos corpos-de-prova dos metais foi realizada por análise microscópica dos metais puros por Microscopia de Força Atômica e Microscopia Óptica.

4.2.2.1 - Microscopia de Força Atômica

Para a avaliação da rugosidade superficial dos corpos-de-prova foi utilizado o microscópio de força atômica (AFM). Os experimentos de AFM foram realizados no Instituto de Física de São Carlos (IFSC) da USP.

4.2.2.2 - Microscopia Óptica

Para a avaliação da rugosidade superficial dos corpos-de-prova foi realizado a microscopia óptica, na Unidade de Mecânica da USP de São Carlos – SP.

O Microscópio utilizado foi da marca Veeco, Wyko (optical profiling system), modelo NT 1100, ilustrado na figura 9.

Figura 9: Microscópio óptico Veeco

4.2.3.1 - Preparo dos Corpos para análise microbiológica

Os corpos-de-prova foram desinfetados com álcool 70% e em seguida, foram colocados individualmente em vidros e esterilizados em estufa de esterilização a 170°C por 60 minutos.

4.2.3.2 - Preparação do Inóculo

As cepas estavam armazenadas em freezer à -21°C com Tryptic Soy Broth (TSB) suplementado de glicerol (Fórmula em anexo). Antes de realizar o procedimento de preparo do inóculo, os tubos foram retirados do freezer e deixados descongelar em temperatura ambiente. Após o descongelamento, uma alíquota de 40µL foi adicionado a 5 mL de Tryptic Soy Broth (TSB) em um tubo estéril e incubado em estufa bacteriológica $\pm 35^{\circ}\text{C}$ por 24 horas. Após esse período, a suspensão bacteriana foi semeada em placa de Agar sangue e Mac Conkey e incubadas em estufa bacteriológica $\pm 35^{\circ}\text{C}$ por 24 horas para reativar as células bacterianas. Com auxílio de

agulha, cinco unidades formadoras de colônias foram transferidas para 10,0 mL de caldo TSB.

O meio TSB contido em tubos foi homogeneizado em vórtex por 15 segundos e a suspensão bacteriana foi acrescida a solução fisiológica estéril até a concentração 10^8 UFC/mL, correspondente a escala 0,5 de Mac Farland.

4.2.3.3 - Formação do Biofilme Bacteriano

O experimento foi realizado de acordo Smith e Hunter (2008), com algumas modificações;

Em uma placa com 24 poços foram colocados os metais puros previamente esterilizados com 1.900 μ L de caldo TSB e 100 μ L da suspensão bacteriana preparada na concentração 10^8 UFC/mL. A placa foi colocada no agitador orbital tipo “mixer” a $\pm 35^\circ\text{C}$ por 24 horas a 80 rpm. Posteriormente, o caldo TSB foi retirado da placa e colocado em um tubo estéril e realizado as diluições seriadas.

A figura 10 ilustra a placa de cultura com 24 POÇOS dos metais chumbo, estanho e níquel. A figura 11 ilustra a placa com os metais incubados com a suspensão bacteriana (bactéria e TSB).

Figura 10: Placa de cultura com os metais chumbo, estanho e níquel.

Figura 11: Placa de cultura com os metais chumbo, estanho e níquel com a suspensão bacteriana.

4.2.3.4 - Preparo da diluição seriada para quantificar as células viáveis

Foram numerados seis tubos (18x180mm) de número 1 até 6 e adicionado nos tubos de número 2 a 6 com 900µL de solução fisiológica estéril. O tubo nº1 corresponde ao da amostra retirado no poço com o corpo-de-prova metálico e 0,1mL dessa suspensão bacteriana foi transferido para os tubos seguintes, da seguinte forma:

A partir da amostra contida no tubo nº1, transferir 1,0mL para o tubo nº2, diluição de 1:10 ou 10^{-1} ; homogeneizar e do tubo nº2 transferir 1,0mL para o tubo nº3, diluição 1:100 ou 10^{-2} , homogeneizar e do tubo nº3 transferir 1,0mL para o tubo nº4, diluição 1:1000 ou 10^{-3} , homogeneizar e do tubo nº4 transferir 1,0mL para o tubo nº5, diluição 1:10.000 ou 10^{-4} , homogeneizar e do tubo nº5, transferir 1,0mL para o tubo nº6, diluição 1:100.000 ou 10^{-5} (Figura 12).

Figura 12: Método da diluição seriada para quantificar células viáveis

4.2.3.5 – Contagem das células viáveis - Método da Gota

Após a diluição seriada da suspensão bacteriana, foi pipetado 10 μ L em forma de gota uma ao lado da outra do inóculo, totalizando 3 gotas, em placas de Petri (90x15mm) contendo o meio sólido Tryptic Soy Agar (TSA). A placa foi levantada e as gotas “escorridas” no meio de cultura. As placas de Petri tampadas foram invertidas e incubadas em estufa bacteriológica a $\pm 35^{\circ}\text{C}$. Após 24 horas de incubação as colônias crescidas foram contadas e multiplicadas pelo fator da diluição (Figura 13).

O número de bactérias por mL da cultura original é calculado multiplicando-se o número de colônias contadas pelo fator de diluição: *Número de células por mL = número de colônias x fator de diluição*

Exemplo: colônias por placa=50

Fator de diluição: 1:1 x 10⁵ (1:100.000)

Volume da diluição adicionado a placa = 0,1mL

50 x 100.000 = 5.000.000 (5 x 10⁶) células/0,1mL

5.000.000 (5 x 10⁶) x 10 = 50.000.000 (5 x 10⁷) células/mL

Figura 13: Placas de TSA incubadas em estufa a 37°C durante 24 horas

4.2.4 - Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Os corpos-de-prova foram removidos do caldo de cultura TSB inoculado com bactéria e lavados com 2mL de salina fisiológica. Posteriormente, foram imersos em glutaraldeído a 2,5 % em tampão fosfato 0,1M (pH 7,1), durante 15 minutos; desidratados em solução de etanol (15, 30, 50, 75, 95 e 100%) 15 minutos em cada solução. Os corpos-de-prova foram colocados em uma placa de cultura de 24 poços, incubados em estufa a $\pm 35^{\circ}\text{C}$ por 24 horas para secagem.

Posteriormente, os corpos-de-prova foram colados em suportes metálicos próprios do equipamento, metalizados com ouro (1KV, 15mAp, 2 minutos, no aparelho Edwards S150 B) e encaixados em câmara a vácuo do microscópio e prontos para análise de varredura eletrônica por meio do microscópio eletrônico de varredura JEOL (JSM-T330A).

4.2.5 – Ensaio de Citotoxicidade *in vitro* - XTT

4.2.5.1 – Esterilização dos Corpos-de-prova

Os corpos-de-prova foram desinfetados com álcool 70% e em seguida, foram colocados individualmente em vidros e esterilizados em autoclave de esterilização a 121°C por 20 minutos.

4.2.5.2 - Preparo do Eluato

A avaliação dos metais foi feita a partir do preparo de eluato, confeccionado de acordo com a ISO 10993-12, de acordo com o peso (0,2 g/mL). Cada metal foi imerso em meio de cultura HAMF10: D-MEN (1:1) com ausência de soro fetal bovino (SFB), a 37°C por 24 horas, sob agitação a 133 rpm em incubadora (New Brunswick Scientific – Excella E24 Incubator Shaker Series).

4.2.5.3 - Cultura Celular e Tratamentos

Para realização dos experimentos foram utilizadas células de ovário de hamster chinês (CHO-K1), com ciclo de divisão de aproximadamente 14 horas, crescidas em meio de cultura HAM-F10:D-MEM (1:1), suplementado com 10% de SFB e kanamicina (1%) mantidas em estufa a 37°C com atmosfera de 5% de CO₂. As células foram cultivadas e repicadas até atingirem a terceira passagem. Para o ensaio de citotoxicidade (ensaio XTT) foram feitas duplicatas onde as células foram tratadas com os eluatos (sem diluição) por 24h. Como referência, cada ensaio contou com duplicatas do controle negativo e controle positivo. Para cada ensaio foram feitas três repetições independentes.

4.2.5.4 - Kit-XTT (Roche Molecular Biochemicals)

Esse teste é baseado na clivagem do sal tetrazólio (sodium 3'- [1-(phenylaminocarbonyl)-3,4-tetrazolium]-bis(4-methoxy-6-nitro) benzene sulfonic acid hydrate) para formar um corante formazan alaranjado. Porém, esta conversão ocorre apenas em células metabolicamente ativas, devido à atividade de desidrogenases mitocondriais. Assim, a quantidade de células metabolicamente ativas (células viáveis) correlaciona-se diretamente com a quantidade de formazan formado, que é solúvel em solução aquosa e pode ser diretamente quantificado usando um espectrofotômetro.

Foram semeadas 20.000 células em placas de 24 poços num volume de 1 mL de meio HAM-F10:D-MEM (1:1) suplementado com 10% de SFB, e incubadas a 37°C em estufa com 5% de CO₂ por 24 horas. No dia seguinte, foram realizados os tratamentos por 24h colocando-se o eluato de cada metal (Fe, Cr, Ni, Sn, Pb), além do controle negativo (CN = poços contendo apenas células com meio de cultura sem SFB e sem eluato). Posteriormente, cada poço recebeu uma suplementação de 10% de SFB com exceção do controle positivo (CP). Para o CP foi utilizado cloridrato de doxorrubicina (3,0 µg/mL por 24 horas). Todos os tratamentos e os CN e CP foram realizados em duplicata.

Após 24 horas, os tratamentos foram removidos de cada poço, as culturas foram lavadas com 250 µL de PBS 1x e inserido meio de cultura HAM-F10:D-MEM (1:1) suplementado com 10% de SFB em todos os poços. No dia seguinte, as culturas foram lavadas com 250 µL de PBS 1x e com a câmara de fluxo laminar com a luz apagada, foi colocado em cada poço 500 µL de meio Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) sem fenol vermelho (CULTLAB) com 60µl da solução XTT/eléctron na proporção de 5000µL:100µL por poço (concentração final de 0,3mg/ml), deixando a 37°C na estufa por 3 horas. Em seguida, foi feita a leitura colorimétrica em espectrofotômetro (VersaMax, Molecular Devices, Sunnyvale, CA) a 492 nm normalizada a 690 nm.

4.2.5.5 - Análise estatística

A análise estatística foi realizada utilizando o Programa Graphpad Prisma 6.0 e os testes foram considerados ao nível de significância de $p < 0.05$. Como os resultados obtidos para o ensaio de XTT foram paramétricos, foi utilizado o teste de Tukey, seguido do teste de Dunnett, o qual toma como referência o controle negativo.

5 – RESULTADOS

5.1 - Caracterização da Superfície

5.1.1 - Microscopia de Força Atômica

Para a avaliação da rugosidade superficial dos corpos-de-prova foi utilizado o microscópio de força atômica (AFM). As tabelas 1 e 2 mostram os resultados da rugosidade quadrática média (Rms/Rq) e a rugosidade média (RA). As figuras 14, 15 e 16 ilustram os resultados da AFM no metal puro chumbo. As figuras 17, 18 e 19 ilustram os resultados da AFM no metal puro estanho. As figuras 20, 21 e 22 ilustram os resultados da AFM no metal puro cromo. As figuras 23, 24 e 25 ilustram os resultados da AFM no metal puro ferro. As figuras 26, 27 e 28 ilustram os resultados da AFM no metal puro níquel.

Tabela 1: Rugosidade média quadrática dos metais chumbo, estanho, cromo, ferro e níquel pela Microscopia de Força Atômica em nanômetro (nm).

Metal	Rms (2 µm)	Rms (5 µm)	Rms (10 µm)
Chumbo	47.886	89.991	162.71
Estanho	17.114	128.91	247.99
Cromo	2.833	1.652	3.087
Ferro	5.046	8.808	11.061
Níquel	4.858	4.601	4.935

Tabela 2: Rugosidade média dos metais chumbo, estanho, cromo, ferro e níquel pela Microscopia de Força Atômica em nanômetro (nm).

Metal	Ra (2 µm)	Ra (5 µm)	Ra (10 µm)
Chumbo	38.258	69.241	126.36
Estanho	13.481	100.81	202.22
Cromo	2.097	1.243	2.217
Ferro	3.689	7.210	9.042
Níquel	3.929	3.662	3.825

Figura 14: Rugosidade do metal puro chumbo em 10 μm

Figura 15: Análise da rugosidade do metal puro chumbo em 10 μm

Figura 16: Rugosidade do metal puro chumbo em 10μm

Figura 17: Rugosidade do metal puro estanho em 10μm

Figura 18: Análise da rugosidade do metal puro estanho 10 μm

Figura 19: Rugosidade do metal puro estanho em 10 μm

Figura 20: Rugosidade do metal puro cromo 10 μm

Figura 21: Análise da rugosidade metal puro cromo 10 μm

Figura 22: Rugosidade do metal puro cromo 10 μm

Figura 23: Rugosidade do metal puro ferro em 10 μm

Figura 24: Análise da Rugosidade do metal puro ferro em 10μm

Figura 25: Rugosidade do metal puro ferro em 10μm

Figura 26: Rugosidade do metal puro níquel em 10 μm Figura 27: Análise da rugosidade do metal puro níquel em 10 μm

Figura 28: Rugosidade do metal puro níquel 10 μm

5.1.2 - Microscopia Óptica

As tabelas 3 e 4 ilustram a rugosidade média quadrática e a rugosidade média dos metais puros chumbo, estanho, cromo, ferro e níquel analisadas através da microscopia óptica, pelo microscópio Wyko, marca Veeco, modelo NT 1100. As figuras 29 ao 43 ilustram os resultados da Microscopia ópticas do metais puros chumbo, estanho, cromo, ferro e níquel.

Tabela 3: Rugosidade média quadrática dos metais chumbo, estanho, cromo, ferro e níquel pela Microscopia Óptica em nanômetro (nm)

Metal	Ra 2,5x	Ra 25x	Ra 100x
Chumbo	175.58	139.60	154.96
Estanho	89.99	61.53	89.60
Cromo	62.94	10.64	12.30
Ferro	71.98	40.65	8.23
Níquel	82.75	13.87	7.68

Tabela 4: Rugosidade média dos metais chumbo, estanho, cromo, ferro e níquel pela Microscopia Óptica em nanômetro (nm).

Metal	Rms 2,5x	Rms 25x	Rms 100x
Chumbo	424.20	209.99	240.52
Estanho	122.65	88.72	123.73
Cromo	92.48	14.54	15.83
Ferro	101.79	54.88	11.84
Níquel	101.74	17.25	10.37

Surface Stats:

Ra: 175.58 nm

Rq: 424.20 nm

Rt: 12.87 um

Measurement Info:

Magnification: 2.51

Measurement Mode: VSI

Sampling: 3.34 um

Array Size: 736 X 480

Figura 29: Metal chumbo 2.5x

Surface Stats:

Ra: 139.60 nm

Rq: 209.99 nm

Rt: 9.47 μm **Measurement Info:**

Magnification: 25.39

Measurement Mode: VSI

Sampling: 330.82 nm

Array Size: 736 X 480

Figura 30: Metal chumbo 25x

Surface Stats:

Ra: 154.96 nm

Rq: 240.52 nm

Rt: 8.94 μm **Measurement Info:**

Magnification: 105.35

Measurement Mode: VSI

Sampling: 79.73 nm

Array Size: 736 X 480

Figura 31: Metal chumbo 100x

Surface Stats:

Ra: 89.99 nm

Rq: 122.65 nm

Rt: 1.56 μm **Measurement Info:**

Magnification: 2.51

Measurement Mode: VSI

Sampling: 3.34 μm

Array Size: 736 X 480

Figura 32: Metal estanho 2.5x

Surface Stats:

Ra: 61.53 nm

Rq: 88.72 nm

Rt: 2.01 μm **Measurement Info:**

Magnification: 25.39

Measurement Mode: VSI

Sampling: 330.82 nm

Array Size: 736 X 480

Figura 33: Metal estanho 25x

Surface Stats:

Ra: 89.60 nm

Rq: 123.73 nm

Rt: 1.85 μ m**Measurement Info:**

Magnification: 105.35

Measurement Mode: VSI

Sampling: 79.73 nm

Array Size: 736 X 480

Figura 34: Metal estanho 100x

Surface Stats:

Ra: 62.94 nm

Rq: 92.48 nm

Rt: 1.86 μ m**Measurement Info:**

Magnification: 2.51

Measurement Mode: VSI

Sampling: 3.34 μ m

Array Size: 736 X 480

Figura 35: Metal cromo 2.5x

Surface Stats:

Ra: 10.64 nm

Rq: 14.54 nm

Rt: 694.46 nm

Measurement Info:

Magnification: 25.39

Measurement Mode: VSI

Sampling: 330.82 nm

Array Size: 736 X 480

Figura 36: Metal cromo 25x

Surface Stats:

Ra: 12.30 nm

Rq: 15.83 nm

Rt: 226.44 nm

Measurement Info:

Magnification: 105.35

Measurement Mode: VSI

Sampling: 79.73 nm

Array Size: 736 X 480

Figura 37: Metal cromo 100x

Surface Stats:

Ra: 71.98 nm

Rq: 101.79 nm

Rt: 1.26 μm **Measurement Info:**

Magnification: 2.51

Measurement Mode: VSI

Sampling: 3.34 μm

Array Size: 736 X 480

Figura 38: Metal ferro 2.5x

Surface Stats:

Ra: 40.65 nm

Rq: 54.88 nm

Rt: 438.20 nm

Measurement Info:

Magnification: 25.39

Measurement Mode: VSI

Sampling: 330.82 nm

Array Size: 736 X 480

Figura 39: Metal ferro 25x

Surface Stats:

Ra: 8.23 nm

Rq: 11.84 nm

Rt: 242.98 nm

Measurement Info:

Magnification: 105.35

Measurement Mode: VSI

Sampling: 79.73 nm

Array Size: 736 X 480

Figura 40: Metal ferro 100x

Surface Stats:

Ra: 82.75 nm

Rq: 101.74 nm

Rt: 643.68 nm

Measurement Info:

Magnification: 2.51

Measurement Mode: VSI

Sampling: 3.34 um

Array Size: 736 X 480

Figura 41: Metal níquel 2.5x

Surface Stats:

Ra: 13.87 nm

Rq: 17.25 nm

Rt: 320.60 nm

Measurement Info:

Magnification: 25.39

Measurement Mode: VSI

Sampling: 330.82 nm

Array Size: 736 X 480

Figura 42: Metal níquel 25x

Surface Stats:

Ra: 7.68 nm

Rq: 10.37 nm

Rt: 241.15 nm

Measurement Info:

Magnification: 105.35

Measurement Mode: VSI

Sampling: 79.73 nm

Array Size: 736 X 480

Figura 43: Metal níquel 100x

5.2 - Formação do Biofilme Bacteriano

5.2.1 - Espalhamento em Placa (Plaques em Superfície)

Após 24 horas de incubação as placas foram retiradas da estufa e verificadas o crescimento bacteriano (Figuras 44, 45, 46 e 47). Dos metais chumbo, estanho, níquel, cromo ferro em todas as bactérias (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus epidermidis* e *Staphylococcus aureus* metilicina resistentes (MRSA) até a diluição 10^{-4} foi verificado crescimento de 100.000 UFC/ML (UFC – unidades formadoras de colônias). A tabela 5 mostra os resultados do crescimento bacteriano na diluição 10^{-5} em UFC/mL dos metais chumbo, estanho, níquel, cromo e ferro.

Tabela 5: Crescimento bacteriano da diluição 10^{-5} dos metais.

Bactéria	Chumbo	Estanho	Níquel	Cromo	Ferro
<i>E. coli</i>	100.000	100.000	100.000	100.000	100.000
<i>P. aeruginosa</i>	100.000	100.000	100.000	100.000	100.000
<i>S. epidermidis</i>	100.000	11.400	100.000	100.000	13.000
<i>S. aureus</i>	100.000	100.000	100.000	100.000	100.000

Figura 44: Crescimento do *S. aureus* no metal chumbo

Figura 45: Crescimento do *S. epidermidis* no metal ferro

Figura 46: Crescimento do *S. epidermidis* no metal estanho.

Figura 47: Crescimento do *P. aeruginosa* no metal estanho.

Figura 48: Crescimento do *E. coli* no metal chumbo.

5.3 – Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Após a incubação dos corpos-de-prova em estufa bacteriológica a $\pm 35^{\circ}\text{C}$ por 24 horas, a superfície dos metais puros foram analisadas para a verificação da formação de biofilme. As figuras 49, 50, 51, 52, 53 e 54 ilustram a formação do biofilme nos diferentes metais puros analisados.

Figura 49: Biofilme de *Escherichia coli* no metal ferro - 5.000x

Figura 50: Biofilme de *Escherichia coli* no metal cromo no aumento de 3.000x

Figura 51: Biofilme de *Pseudomonas aeruginosa* no metal chumbo - 2.000x

Figura 52: Biofilme do *Staphylococcus aureus* no metal chumbo - 5.000x

Figura 53: Biofilme do *Staphylococcus epidermidis* no metal cromo - 3.000x

Figura 54: Biofilme do *Staphylococcus epidermidis* no metal estanho - 5.000x

5.4 – Ensaio de Citotoxicidade *in vitro* – XTT

A absorbância obtida após a leitura colorimétrica em espectrofotômetro é diretamente proporcional ao número de células metabolicamente ativas (células viáveis). A viabilidade celular está relacionada com a medida de absorbância. O Controle Negativo (CN) foi considerado como 100% de viabilidade celular.

A figura 55 ilustra a placa do ensaio XTT, utilizado para avaliação da viabilidade celular. A figura 56 mostra a média e o erro padrão da viabilidade celular obtida pelo ensaio XTT.

Figura 55: Ensaio XTT para avaliação da viabilidade celular. Quarto dia: placa de 24 poços contendo meio DMEN sem fenol vermelho com solução XTT/eléctron após 3 horas. Poços com cor laranja mais forte correspondem à maior conversão de tetrazóico em formazan por células metabolicamente ativas.

Figura 56: Ensaio XTT. As colunas indicam o valor médio de viabilidade celular (%) para os metais estudados. Barras indicam o erro padrão. *** indica diferença estatisticamente significativa em relação ao controle negativo ($p < 0,0001$). Teste de Dunnett.

Considerando a viabilidade celular do controle negativo como referência (teste de Dunnett), verificou-se que os metais cromo, níquel, estanho e chumbo não demonstraram diferença estatisticamente em relação ao CN ($p > 0,05$; Dunnett). Assim, estes metais não interferiram significativamente a viabilidade celular, mostrando-se não citotóxicos. Já o ferro apresentou diferença estatisticamente significativa em relação ao CN ($p < 0,0001$; Dunnett), promovendo redução da viabilidade celular em torno de 60%, mostrando-se citotóxico.

6 – DISCUSSÃO

A presente pesquisa mostra a aderência e a formação de biofilme dos micro-organismos *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus epidermidis* e *Staphylococcus aureus* sobre a superfície dos metais puros chumbo, cromo, estanho, ferro e níquel. E demonstra por contagem de células viáveis e citotoxicidade que os metais analisados não interferem na aderência e formação de biofilme conforme o proposto nesse estudo, como descrito a seguir: a contagem das células viáveis demonstrou a recuperação de 100.000 UFC/mL dos micro-organismos *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus* na superfície dos metais chumbo, cromo, estanho, ferro e níquel. Foi possível constatar uma redução de 10^3 na viabilidade celular, uma vez que o inóculo inicial foi 10^8 UFC/mL. O micro-organismo *Staphylococcus epidermidis* foi recuperado em menor quantidade nos metais estanho e ferro, com crescimento de 11.400 e 13.000 UFC/mL, respectivamente. Nos metais chumbo, cromo e níquel a quantidade das células viáveis recuperadas foi de 100.000 UFC/mL, sendo a mesma dos demais metais (ferro e estanho), havendo uma pequena redução no crescimento bacteriano, pois o inóculo inicial era 10^8 .

Os metais chumbo e estanho são metais pesados e altamente tóxicos, mesmo em baixas concentrações. Segundo Koechler e seus colaboradores (2015), apesar dos efeitos tóxicos dos metais pesados, muitos micro-organismos são capazes de colonizar esses metais por desenvolverem mecanismos de resistência. Uma estratégia de proteção adaptada por várias bactérias quando expostas a metais tóxicos são promover a formação de um biofilme. Templeton e seus colaboradores (2003), observaram que micro-organismos gram-negativos como cepas de *Citrobacter* sp., *Pseudomonas aeruginosa* e *Burkholderia cepacia* desenvolveram a formação de biofilme em superfície do chumbo que é um metal pesado e tóxico. A fixação bacteriana é o primeiro passo no desenvolvimento de um biofilme, assim como desempenhando um papel chave neste processo. No entanto, a eficiência do processo de fixação e/ou a agregação das células bacterianas parece depender do metal envolvido e da sua concentração. No presente estudo todos os metais

utilizados foram classificados com uma pureza de 98%.

Na presente pesquisa, foi utilizada a microscopia eletrônica de varredura para avaliação do biofilme da bactéria *Escherichia coli* sobre a superfície do metal níquel. Koechler e seus colaboradores (2015) observaram que em cepas de *Escherichia coli* foi encontrada aumento de propriedades de aderência e formação do biofilme quando em contato com o metal níquel (Ni).

Segundo Hancock e seus colaboradores (2010) houve redução na formação do biofilme nos metais zinco e cobalto nos isolados de *Escherichia coli* e *Klebsiella* sp. No estudo de Xiong *et al.* (2009), os autores mostraram que o metal cobre em superfície é um excelente antibacteriano, diminuindo significativamente a formação de biofilme das bactérias *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*. Elementos metálicos contendo prata e cobre possuem propriedades antibacterianas.

Yasuyuki e seus colaboradores (2010) demonstraram que houve a redução na formação de biofilme do micro-organismo *Staphylococcus aureus* nos metais puros: titânio, cobalto, níquel, cobre, zircônio, molibdênio e chumbo. No presente estudo, não houve redução na formação do biofilme da bactéria *Staphylococcus aureus* nos metais puros chumbo, cromo, estanho, ferro e níquel. Porém, concordando com Yasuyuki *et al* (2010), o metal puro estanho mostrou baixo efeito antimicrobiano eficaz para o micro-organismo *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*, sendo o mesmo resultado evidenciado na presente pesquisa.

Vários micro-organismos, plantas e invertebrados são conhecidos por serem tolerantes a metais pesados, por sua capacidade de acumular íons metálicos no organismo intra ou extracelularmente. Muitos micro-organismos, incluindo fungos, bactérias, leveduras e algas podem seqüestrar metais pesados no meio extracelular (YASUYUKI *et al.*, 2010).

Em relação ao acúmulo intracelular de metais pesados por micro-organismos, Ahalya e seus colaboradores (2003) descreveram dois grupos: metabolismo dependente e não-dependente. Na categoria metabolismo dependente os íons metálicos são transportados através da membrana celular e se acumulam intracelularmente, enquanto na categoria metabolismo não-dependente, a absorção de íons metálicos é obtida por interação físico-química entre a membrana da célula e

os íons metálicos, por exemplo, adsorção física ou absorção química.

Os íons metálicos acumulados podem afetar os micro-organismos de duas maneiras: formas diretas e indiretas. Os íons dissolvidos indiretamente afetam as bactérias por meio de incorporação na proteína bacteriana, tornando a proteína não funcional e/ou resultando em mau funcionamento. Por outro lado, resultados de dissolução de metais na formação de radicais ativos que afetam diretamente as bactérias, resultam na ruptura da parede celular e na morte bacteriana (YASUYUKI *et al.*, 2010).

No presente estudo, foram utilizados dois tipos de bactérias, as bactérias Gram-positivas (*S. aureus* e *S. epidermidis*) e as Gram-negativas (*E. coli* e *P. aeruginosa*). Estas bactérias apresentaram diferentes níveis de tolerância à íons metálicos e esta característica poderia ser atribuída à diferença na estrutura da parede celular. As bactérias gram-positivas contêm uma camada espessa de peptidoglicano na parede celular, podendo reduzir a penetração dos íons dos metais tóxicos. As bactérias gram-negativas, por outro lado, possuem uma camada fina de peptidoglicano e porinas presentes na membrana externa que podem facilitar a entrada de substâncias de baixo peso molecular na célula bacteriana (YASUYUKI *et al.*, 2010).

Concordando com Yasuyuki *et al.* (2010), os resultados não mostraram diferença significativa no limite de tolerância dos íons metálicos pelos dois tipos de bactérias (gram-positivas e gram-negativas). A bactéria que apresentou crescimento em menor quantidade nos metais estanho e ferro, de 11.400 UFC/mL e 13.000 UFC/mL, respectivamente, foi o *Staphylococcus epidermidis*. Nos metais chumbo, cromo e níquel, a quantidade foi igual dos outros metais de 100.000 UFC/mL. A bactéria *Staphylococcus epidermidis* faz parte da microbiota da pele e membranas mucosas de humano (LEITE *et al.*, 2011), entretanto, atualmente o *Staphylococcus epidermidis* e outros estafilococos coagulase negativos (ECN) são considerados como importantes patógenos associados a infecções nosocomiais, sendo considerado um patógeno oportunista (GOMES *et al.*, 2009). Estudos realizados por Vermont *et al.* (1998), o *S. epidermidis* é reconhecido ser um dos mais comuns causadores de sérias infecções nosocomiais e apresenta capacidade de aderir à

dispositivos médicos e formar biofilme.

O presente estudo observou a formação do biofilme bacteriano nos corpos-de-prova por meio de microscopia eletrônica de varredura, concordando com o estudo de Koechler e seus colaboradores (2015), no qual foi demonstrado que os biofilmes bacterianos são muitas vezes tolerantes e resistentes a metais tóxicos. Coraça-Huber e seus colaboradores (2012) utilizaram a MEV para observar a formação de biofilme do micro-organismo *Staphylococcus aureus*. Souza *et al.* (2009) observaram, por meio de microscopia eletrônica de varredura e microscopia de força atômica, aderência e formação de biofilme de *S. epidermidis* a partir de duas horas de incubação do corpo-de-prova.

Segundo Katsikogianni *et al.* (2006), a hidrofobicidade e a rugosidade do substrato são as propriedades mais importantes envolvidas no fenômeno de adesão bacteriana. As irregularidades aumentam a área de superfície, e promovem um maior favorecimento e surgimento de sítios adicionais para colonização bacteriana, tal como rachaduras que protegem as células bacterianas, porém, nem sempre é confirmada uma relação linear entre adesão bacteriana e rugosidade superficial.

Harimawan e seus colaboradores (2011) utilizaram a microscopia de força atômica (AFM) para avaliar a força de adesão entre bactérias e aço inoxidável. Tsoligkas *et al* (2012) utilizou a AFM para verificar a força de aderência do biofilme de *Escherichia coli*. Para a avaliação da rugosidade superficial dos corpos-de-prova foram utilizadas AFM e a microscopia óptica. Nos dois métodos utilizados os metais considerados mais rugosos foram o chumbo e o estanho.

O chumbo é um metal pesado altamente tóxico, cuja utilização tem generalizado extensiva contaminação ambiental resultando em problemas de saúde em muitas partes do mundo. O metal chumbo provoca toxicidade em células vivas, seguido de stress oxidativo, resultando em apoptose celular. Muitos pesquisadores mostraram que o stress oxidativo em células vivas é causada pelo desequilíbrio entre a produção de radicais livres e a geração de antioxidantes para desintoxicar ou reparar o dano resultante (JAISHANKAR *et al.*, 2014). Para determinar as atividades dos íons metálicos no ambiente, a especificação do metal é muito importante, onde o Cr (VI) é tóxico para os humanos. A presente pesquisa não demonstrou a toxicidade

dos metais chumbo e estanho.

Segundo Silva *et al.* (2008), o ensaio XTT tem sido usado como uma ferramenta rotineira para a quantificação celular, no estudo citotóxico de materiais, ao medir a atividade metabólica das células (viabilidade celular). A redução intracelular dos compostos do Kit - XTT liberam o formazan, um composto que pode ser quantificado através da estimativa colorimétrica. KUHN e seus colaboradores (2002) apontaram o uso do ensaio do XTT como uma importante ferramenta para quantificação de células em biofilme. De acordo com Altman (1976) os ensaios colorimétricos de viabilidade celular são importantes ferramentas no estudo da atividade de células eucarióticas, principalmente as técnicas envolvendo o uso de sais de tetrazólio. O formazan é solúvel em água, podendo ser facilmente mensurado no sobrenadante celular. Essa característica é importante, pois permite o estudo de biofilmes intactos, assim como examinar a sua suscetibilidade a drogas, sem romper sua estrutura (ALTMAN, 1976; KUHN *et al.*, 2002). A técnica de redução do sal de tetrazólio (XTT) é mais fácil de ser empregada, por ser menos laboriosa e fornecer resultados mais rapidamente, apesar de apresentar um custo elevado. A quantificação por meio de cultura, utilizando método microbiológico convencional, é mais trabalhosa e demorada, porém apresenta custo mais baixo que o anterior.

Dessa forma, avaliou-se a atividade mitocondrial das células CHO-K1 após passarem pelo tratamento de 24 horas com os diferentes metais por meio do ensaio XTT, sendo observada a não citotoxicidade avaliada pela viabilidade celular dos metais Cr, Ni, Sn e Pb. Porém, o Fe promoveu dano à atividade mitocondrial da célula, mostrando-se citotóxico.

A presente pesquisa concorda com Jaishankar *et al.* (2014), demonstrando que o metal ferro causa toxicidade e dano tecidual celular. Os radicais livres do metal ferro produzido destroem o DNA, resultando em dano celular, posteriormente morte celular (JAISHANKAR *et al.*, 2014).

Em células eucarióticas e procarióticas, a toxicidade dos metais depende se eles são ou não os metais essenciais, a sua especificação e sua concentração. Metais redox-ativo essenciais tais como o ferro (Fe), cobre (Cu), cromo (Cr) e cobalto (Co), que sofrem reações de ciclisto envolvidas em processos de

transferência de elétrons, são tóxicos quando estão presentes em excesso, ao passo que metais não essenciais, como arsênio (As), mercúrio (Hg), chumbo (Pb) e cádmio (Cd) são tóxicos, mesmo em concentrações muito baixas. Apesar destes efeitos tóxicos, muitos micro-organismos são capazes de colonizar esses metais, por desenvolverem mecanismos de resistência (KOECHLER *et al.*, 2015). Os resultados demonstraram a formação de biofilme dos micro-organismos *Escherichia coli* (ESBL), *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus epidermidis* e *Staphylococcus aureus* meticilina resistente (MRSA), sobre a superfície dos metais essenciais (ferro e cromo) e não-essencial (chumbo).

7 – CONCLUSÃO

A microscopia de força atômica e microscopia óptica apresentaram resultados semelhantes, sendo as duas técnicas eficazes para avaliar a rugosidade de metais puros. O metal que apresentou a maior rugosidade média quadrática foi o chumbo, seguido do estanho, ferro, níquel e cromo, não interferindo no crescimento de quaisquer micro-organismos analisados.

A avaliação quantitativa das células viáveis dos micro-organismos *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus epidermidis* e *Staphylococcus aureus* demonstrou crescimento de 100.000 unidades formadoras de colônia/mL nos metais chumbo, cromo, estanho, ferro e níquel, resultando em redução no crescimento bacteriano.

A observação por meio de microscópio eletrônico de varredura (MEV) mostrou a formação do biofilme dos micro-organismos *Escherichia coli* (ESBL), *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus epidermidis* e *Staphylococcus aureus* metilina resistentes (MRSA) nos metais chumbo, cromo, estanho, ferro e níquel.

O ensaio de citotoxicidade *in vitro* XTT, o qual avalia a viabilidade celular, mostrou que o metal ferro apresentou citotoxicidade significativa em relação aos demais metais puros analisados em células CHO-K1.

Mais estudos e outras metodologias são necessárias para conhecer as propriedades antibacterianas dos metais puros e sua aplicação.

8 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHALYA, N. RAMACHANDRA, T.V.; KANAMADI, R.D. Biosorption of Heavy Metals. **Research Journal Of Chemistry And Environment**. v. 7, p. 71-78, 2003.

ALTMAN, F.P. Tetrazolium salts and formazans. **Progress in histochemistry and cytochemistry**, v.9, p1–56, 1976.

AUDETTE, G.F; HAZES, B. J. Development of protein nanotubes from a multi-purpose biological structure. *Nanosci.* **Nanotechnol**, v. 7, p. 2222-2229, 2007.

BERNARDI, A.C.A.; PIZZOLITTO, E.L.; PIZZOLITTO, A.C.; Detecção da produção de slime por estafilococos coagulase-negativa isolados de cateter venosos central. **Rev Ciênc Farm Básica Apl**. v. 28, p. 57-66, 2007.

CORAÇA-HUBER, D.C.; FILLE, M.; HAUSDORFER, J.; PFALLER, K.; NOGLER, M., *Staphylococcus aureus* biofilm formation and antibiotic susceptibility tests on polystyrene and metal surfaces. **Journal of Applied Microbiology** , v. 112, p. 1235-1243 , 2012.

COSTERTON, JW; MONTANARO, L.; ARCIOLA, C.R. Biofilm in implant infections: its production and regulation. **Int J Artif Organs**, v. 28, p. 1062-1068, 2005.

COSTERTON, JW; STEWART, P.S.; GREENBERG, E.P. Bacterial biofilm: a common cause of persistent infections. **Science**. v. 284, p. 1318-1322, 1999.

DAHINDEN, C. A.; FEHR, J.; HUGLI, T. E. Role of cell surface contact in the kinetics of superoxide production by granulocytes. **J. Clin. Invest.**, v. 72, p. 113–21, 1983.

DOROBANTU, L.S. GOSS, G.G. BURRELL, R.E. Atomic force microscopy: A nanoscopic view of microbial cell surfaces. **Elservier**. p. 1-11, 2012.

DUNNEY, W. Bacterial adhesion: seen any good biofilms lately? **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 15, p. 155-166, 2002.

FANG, H.; CHAN, K.; XU, L. Quantification of bacterial adhesion forces using atomic force microscopy (AFM). **J Microbiol Meth**, v. 40, p. 89-97, 1999.

FERREIRA, A.A.P.; HIDEKO, Y. Microscopia de força atômica aplicada me imunoensaios. **Quim. Nova**, v. 29, n. 1, p. 137-142, 2006.

GOMES, F.I.A.; TEIXEIRA, E.P.; AZEVEDO, J.; OLIVEIRA, R.C. Effect of Farnesol on Planktonic and Biofilm Cells of *Staphylococcus epidermidis*. **Curr Microbiol.** v. 59, p.118–122, 2009.

HANCOCK, V.; DAHL, M.; KLEMM, P. Abolition of Biofilm Formation in Urinary Tract *Escherichia coli* and *Klebsiella* Isolates by Metal Interference through Competition for Fur. **Appl. Environ. Microbiol.** v. 76, n. 12, p. 3836–3841, 2010.

HARIMAWAN, A.; RASJASEKAR, A.; TING, Y. Bacteria attachment to surfaces – AFM force spectroscopy and physicochemical analyses. **Elsevier**. v. 364, p. 213-218, 2011.

HU, Y.; ULSTRUP, J.; ZHANG, J.; MOLIN, S.; DUPRES, V. Adhesive properties of *Staphylococcus epidermidis* probed by atomic force microscopy. **Phys. Chem. Chem. Phys.** v. 13, p. 9995–10003, 2010.

JAISHANKAR, M.; TSETEN, T.; ANBALAGAN, N.; MATHEW, B.B.; BEEREGOWDA, K.N. Toxicity, mechanism and health effects of some heavy metals. **Toxicology**. v. 7, p. 60-72, 2014.

LEITE, B.; GOMES, F.; TEIXEIRA, P.; SOUZA, C.; PIZZOLITTO, E.; OLIVEIRA, R. In vitro Activity of Daptomycin, Linezolid and Rifampicin on *Staphylococcus epidermidis* Biofilms. **Curr Microbiol.** v. 63, p. 313–317, 2011.

LIU, Y.; ZHAO, Q. Influence of surface energy of modified surfaces on bacterial adhesion. **Biophysical Chemistry**. v. 117, p. 39-45, 2005.

KASNOWSKI, M. C.; MANTILLA, S.P.S.; OLIVEIRA, L. A. T.; FRANCO, R. M. Formação de biofilme na indústria de alimentos e métodos de validação de superfícies. **Revista científica eletrônica de medicina veterinária**. n. 15, p. 1-23, 2010.

KATSIKOIANNI, M.; SPILIOPOULOU, I.; DOWLING, D. P.; MISSIRLIS, Y. F. Adhesion of slime producing *Staphylococcus epidermidis* strains to PVC and diamond-like carbon/silver/fluorinated coatings. **J. Mater. Sci. Mater. Med.**, v. 17, n. 8, p. 679-689, 2006.

KOECHLER, S.; FARASIN, J.; CLEISS-ARNOLD, J.; ARSENE-PLOETZE, F. Toxic metal resistance in biofilms: diversity of microbial responses and their evolution. **Research in Microbiology**. v. p. 1-10. 2015.

KUHN, D. M. ; CHANDRA, J. ; MUHHERJEE. Comparison of biofilms formed by *Candida albicans* and *Candida parapsilosis* on bioprosthetic surfaces. **Infection and Immunity**, Washington, v.70, p.878–888, 2002.

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

NOYCE, J.O.; MICHELS H.; KEEVIL, C.W. Potential use of copper surfaces to reduce survival of epidemic meticillin-resistant *Staphylococcus aureus* in the healthcare environment. **Journal of Hospital Infection**, v. 63, p 289-297, 2006.

PADILHA, A F. **Materiais de Engenharia**. Hemus Editora Limitada, 1997.

PIZZOLITTO, EL. **Contribuição ao estudo *in vitro* da corrosão induzida por microrganismos sobre liga metálica a base de cobre, de uso na Odontologia – Modelo experimental com as cepas cariogênicas *Streptococcus mutans* e *Streptococcus sobrinus***. 1997. 117f. Tese (Doutorado em Biotecnologia). Instituto de Química, UNESP, Araraquara, 1997.

REHM, B. H. A. Pseudomonas: model organism, pathogen, cell factory. **Ed. Wiley-VCH**, p. 216, 2008.

SILVA, W. J.; SENEVIRATNE, J.; PARAHITIYAWA, N.; ROSA, E. A. R.; SAMARANAYAKE, L. P.; DEL BEL CURY, A. A. Improvement of XTT Assay Performance for Studies involving *Candida albicans* Biofilms. *Brazilian Dental Journal*, v.19, n.4, p.364-369, 2008.

SCHEUERMAN, T. R.; CAMPER, A. K.; HAMILTON, M. A. Effects of substratum topography on bacterial adhesion. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 208, n. 1, p. 23-33, 1998.

SMITH, K; HUNTER, S. Efficacy of common hospital biocides with biofilms of multi-drug resistant clinical isolates. **Journal of Medical Microbiology**, v. 57, p. 966–973, 2008.

SOUZA, C.; TEIXEIRA, P.; OLIVEIRA, R. Influence of surface properties on the adhesion of *Staphylococcus epidermidis* to acrylic and silicone. **International Journal of Biomaterials**, v. 2009, p. 01-09, 2009.

TEMPLETON, A.S.; TRAINOR, T.P.; SPRMANN, A.M.; NEWVILLE, M.; SUTTON, S.R.; DOHNALKOVA, A.; GORBY, Y.; JR, G.E.B. Sorption versus Biomineralization of Pb(III) within *Burkholderia cepacia* Biofilms. **Environ. Sci. Technol.** v. 37. n. 2. 2003.

TSOLIGKAS, A.N.; BOWEN, J.; WINN, M.; GOSS, R.J.M.; OVERTON, T.W.; SIMMONS, M.J.H. Characterisation of spin coated engineered *Escherichia coli* biofilms using atomic force microscopy. **Colloids and Surfaces B**. v. 89. p. 152-160, 2012.

VERMONT, C.; HARTWIG, N.; FLEER, A.; DE MAN, P.; VERBRUGH, H.; VAN DER ANKER, J.; DE GROOT, R.; VAN BELKUN, A. Persistence of clones of coagulase-negative staphylococci among premature neonates in neonatal intensive care units: 2-center study of bacterial genotyping and patient risk factors. **J. Clin. Microbiol.**, v. 36, p. 2485-2490, 1998.

XIONG, J.; XU, B.; NI, H. ; Antibacterial and corrosive properties of copper implanted austenitic stainless steel. **International Journal of Minerals, Metallurgy and Materials**, v. 16, n.3, p. 293, 2009.

YASUYUKI, M.; KUNIHIRO, K.; KURISSERY, S.; KANAVILLIL, N.; SATO, Y.; KIKUCHI, Y. Antibacterial properties of nine pure metals: a laboratory study using *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. **Biofouling**. p. 851-858, 2010.

YU, B; LESIUK, A; DAVIS, E; IRWIN, R. T.; LI, D. Y. Surface nanocrystallization for bacterial control. **Langmuir**. v. 26, p. 10930-10934, 2010.

9 - ANEXOS

9.1 – Meios de Cultura e Soluções

Os meios de cultura utilizados foram: Caldo Soja Tríplica (Tryptic Soy Broth – TSB) e Ágar Soja Tríplica (Tryptic Soy Ágar – TSA).

9.1.1 - Caldo Soja Tríplica (Tryptic Soy Broth – TSB)

Peptona de Caseína	17,0 g
Peptona de Soja	3,0 g
Cloreto de Sódio	5,0 g
Glicose	2,5 g
Fosfato de Potássio	2,5 g
Água destilada	1000 mL

De acordo com as instruções do fabricante, hidratar com água Mili Q, esterilizar em autoclave durante 15 minutos a 121°C e dispensar.

9.1.2 - Soja Tríplica (Tryptic Soy Ágar – TSA)

Peptona de Caseína	15,0 g
Peptona de Soja	5,0 g
Cloreto de Sódio	5,0 g
Ágar	1,5 g
Água destilada	1000 mL

De acordo com as instruções do fabricante, hidratar com água Mili Q, esterilizar em autoclave durante 15 minutos a 121°C e dispensar como desejar.

9.1.3 – Reagentes utilizados no preparo dos corpos-de-prova para análise por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Tampão Fosfato 0,2 M (pH 7,1)

Solução A 33,0 mL

Solução B 67,0 mL

Solução A

Fosfato monobásico de sódio (Merk)..... 2,76 g
 Água destilada q.s.p 100,00 mL

Solução B

Fosfato dibásico de sódio (Merk)..... 7,17g
 Água destilada q.s.p 100,0mL

Tampão Fosfato 0,1M (pH 7,1)

Tampão fosfato 0,2M e pH 7,1 50,0 mL
 Água destilada 50,0 mL

Solução Tampão 0,1 (pH 7,1) M-Glutaraldeído a 2,5%

Tampão 0,1 M (pH 7,1) 48,50 mL
 Glutaraldeído a 50% em solução aquosa (Fluka) 2,50mL

Solução de etanol a 15%

Álcool etílico absoluto P.A (Merck) 15,0 mL
 Água destilada 85,0 mL

Solução de etanol a 30%

Álcool etílico absoluto P.A (Merck) 30,0 mL
 Água destilada 70,0 mL

Solução de etanol a 50%

Álcool etílico absoluto P.A (Merck) 50,0 mL
 Água destilada 50,0 mL

Solução de etanol a 70%

Álcool etílico absoluto P.A (Merck) 70,0 mL
 Água destilada 30,0 mL

Solução de etanol a 95%

Álcool etílico absoluto P.A (Merck) 95,0 mL

Água destilada 5,0 mL

Solução de etanol a 100%

Álcool etílico absoluto P.A (Merck) 100,0 mL

Tabela 6: Cepa de Campo 1 - Bactéria: *Staphylococcus epidermidis*

Amostra Clínica: Sangue

Antibiótico	MIC	Interpretação
Amoxicilina + Clavulanato de Potássio	> 4/2	R
Ampicilina + Sulbactam	> 8/4	R
Ampicilina	> 8	BLAC
Ceftriaxona	> 32	R
Ciprofloxacina	> 2	R
Daptomicina	≤ 0.5	S
Eritromicina	> 4	R
Gentamicina	> 8	R
Levofloxacina	> 4	R
Linezolida	≤ 1	S
Moxifloxacina	> 4	R
Oxacilina	> 2	R
Penicilina	> 8	BLAC
Rifampicina	> 2	R
Synercida	≤ 0.5	S
Tetraciclina	≤ 4	S
Sulfametoxazol+Trimetropim	> 2/38	R
Vancomicina	2	S

Tabela 7: Cepa de Campo 2 - Bactéria: *Staphylococcus aureus*

Amostra Clínica: Sangue

Antibiótico	MIC	Interpretação
Amoxilina + Clavulanato de Potássio	> 4/2	R
Ampicilina + Sulbactam	> 8/4	R
Ampicilina	> 8	BLAC
Cefoxitina Screen	> 4	Pos
Ceftriaxona	> 32	R
Ciprofloxacina	> 2	R
Daptomicina	≤ 0.5	S
Eritromicina	> 4	R
Gentamicina	≤ 4	
Levofloxacina	> 4	R
Linezolida	4	S
Moxifloxacina	> 4	R
Oxacilina	> 2	R
Penicilina	> 8	BLAC
Rifampicina	≤ 1	R
Synercida	≤ 0.5	S
Tetraciclina	≤ 4	S
Sulfametoxazol+Trimetropim	> 2/38	R
Vancomicina	2	S

Tabela 8: Cepa de Campo 3 - Bactéria: *Pseudomonas aeruginosa*

Amostra Clínica: Sangue

Antibiótico	MIC	Interpretação
Amicacina	> 32	R
Aztreonam	16	I
Cefepime	> 16	R
Cefotaxima	> 32	R
Ceftazidima	> 16	R
Ceftriaxona	> 32	R
Ciprofloxacina	> 2	R
Gentamicina	> 8	R
Imipenem	> 8	R
Levofloxacina	> 4	R
Meropenem	> 8	R
Piperaciclina+Tazobactam	64	S
Piperaciclina	> 64	R
Tobramicina	> 8	R

Tabela 9: Cepa de Campo 4 - Bactéria: *Escherichia coli*

Amostra Clínica: Sangue

Antibiótico	MIC	Interpretação
Amicacina	≤ 16	S
Ampicilina + Sulbactam	$> 8/4$	S
Ampicilina	> 8	R
Aztreonam	16	R
Cefepime	> 16	R
Cefotaxima	> 32	ESBL
Cefotetan	> 16	R
Ceftazidima	8	ESBL
Ceftriaxona	> 32	ESBL
Cefuroxima	> 16	R
Cefalotina	> 16	R
Ciprofloxacina	> 2	R
Ertapenem	≤ 1	S
Gentamicina	≤ 4	S
Imipenem	≤ 1	S
Levofloxacina	> 4	R
Nitrofurantoína	≤ 32	S
Piperaciclina+Tazobactam	≤ 16	S
Piperaciclina	> 64	R
Tetraciclina	> 8	R
Tigeciclina	≤ 2	S
Tobramicina	≤ 4	S
Sulfametoxazol+Trimetropim	$> 2/38$	R