

MARISA DE FATIMA COSTA SOUZA

**AVALIAÇÃO QUANTITATIVA DA INTERAÇÃO DAS MOLÉCULAS DE PHMB E
DE AMPICILINA COM AS CÉLULAS DE *STAPHYLOCOCCUS AUREUS***



**Monografia apresentada ao Instituto de
Microbiologia Paulo de Góes, como pré-
requisito para a obtenção do grau de
Bacharel em Ciências Biológicas:
Microbiologia e Imunologia.**

**INSTITUTO DE MICROBIOLOGIA PAULO DE GÓES
UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
RIO DE JANEIRO
DEZEMBRO/2019**

Trabalho realizado no Departamento de Virologia, do Instituto de Microbiologia Paulo de Góes, UFRJ, sob a orientação do Professor: Maulori Curié Cabral.

FICHA CATALOGRÁFICA**CIP - Catalogação na Publicação**

C719a Costa Souza, Marisa de Fatima
Avaliação quantitativa da interação das moléculas de PHMB e de ampicilina com as células de Staphylococcus aureus / Marisa de Fatima Costa Souza. -- Rio de Janeiro, 2019.
xiii, 43 f.

Orientador: Maulori Curié Cabral.
Trabalho de conclusão de curso (graduação) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Microbiologia, Bacharel em Ciências Biológicas: Microbiologia e Imunologia, 2019.

1. Interação bactéria-hospedeiro. 2. Interação antisséptico-bactéria. 3. Poli-Hexa-Metilen Biguadina. 4. MRSA. 5. Inibição do crescimento bacteriano. I. Curié Cabral, Maulori, orient. II. Título.

**INSTITUTO DE MICROBIOLOGIA PAULO DE GÓES / UFRJ
COORDENAÇÃO DE ENSINO DE GRADUAÇÃO**

**ATA DA APRESENTAÇÃO DE MONOGRAFIA PARA APROVAÇÃO
NO RCS DE TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO,
BACHARELADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: MICROBIOLOGIA E
IMUNOLOGIA**

ALUNO: **Marisa de Fatima Costa Souza**
DRE: 112111339

BANCA EXAMINADORA: Prof. Sérgio Eduardo Longo Fracalanza (Presidente)
Prof. Leandro Stefano Sangenito
Profa. Lígia Maria Torres Peçanha
Profa. Bernadete Teixeira Ferreira Carvalho (Suplente)

Título da Monografia: **"Avaliação quantitativa da interação das moléculas de PHMB e de ampicilina com as células de *Staphylococcus aureus*"**

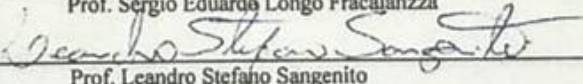
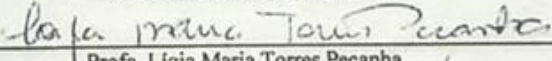
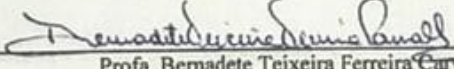
Local: Sala I0-57 / Departamento de Virologia / IMPPG / CCS / UFRJ
Data e hora de início: 13 de dezembro de 2019 às 10:00h

Em sessão pública, após exposição de cerca de 50 minutos, o aluno foi argüido pelos membros da Banca Examinadora, demonstrando suficiência de conhecimentos e capacidade de sistematização no tema de sua Monografia, tendo, então, obtido nota 7,7 neste requisito do RCS de **TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO**. Na forma regulamentar, foi lavrada a presente ata que é assinada pelos membros da banca examinadora, aluno, orientador (e/ou co-orientador) e pelo coordenador do RCS.

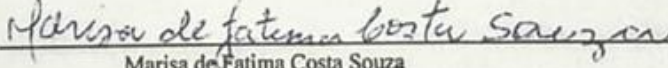
Rio de Janeiro, 13 de dezembro de 2019.

NOTA

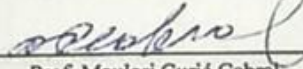
Banca Examinadora:

5,0	Prof. Sérgio Eduardo Longo Fracalanza  Prof. Leandro Stefano Sangenito
7,0	Profa. Lígia Maria Torres Peçanha  Profa. Lígia Maria Torres Peçanha
8,0	Profa. Bernadete Teixeira Ferreira Carvalho  Profa. Bernadete Teixeira Ferreira Carvalho

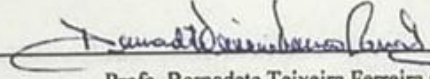
Aluno:


Marisa de Fatima Costa Souza

Orientador:


Prof. Maulori Curié Cabral

Coordenador
de TCC


Profa. Bernadete Teixeira Ferreira Carvalho

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, a Deus por ter me dado a fé para galgar essa carreira profissional. À minha família pelo carinho e apoio ao longo dessa árdua jornada de sete anos. Agradeço imensamente ao professor Maulori Curié Cabral pelas oportunidades que me concedeu ao longo da iniciação científica. Tenho pleno reconhecimento das oportunidades que me foram oferecidas no IMPPG e dos ensinamentos profissionais que me foram fornecidos nessa Instituição. Toda essa experiência me fez crescer como pessoa. Serei eternamente grata à Instituição e, especial, às professoras Maria Isabel Madeira Liberto e Thais Cristina Baeta Souto-Padrón (*in memória*), não apenas como professoras, mas também como amigas. Meu reconhecimento de gratidão às coordenadoras do Curso de Bacharelado, Professoras Lígia Maria Torres Peçanha e Kátia Regina Santos Neto pelo acompanhamento durante a minha formação acadêmica e da minha tutora Bernadete Teixeira de Carvalho. Delas, sempre recebi o incentivo que me conduziu a persistir. Meu muito obrigado! Aos professores Sérgio Fracalanza e Leandro Stefano Sangenito pelas contribuições para o aprimoramento do desenho experimental deste projeto. À Marleide do Nascimento Jose, pela ajuda técnica fornecida no laboratório a quem passei a considerar como uma irmã e ao Marlei Gomes da Silva pela expertise nas moléculas de Polihexametileno Biguanida e pelas muitas considerações que foram incluídas nesta Monografia. Aos amigos e colaboradores Andréa de Andrade Rangel de Freitas, Bruno de Souza Scramignon Costa, Tarcísio Correa e a professora Fernanda Abreu. Um agradecimento especial à bolsa auxílio da UFRJ que tanto contribuiu para a minha permanência na universidade que sem ela nada disso teria sido possível acontecer.

"A evolução das pesquisas científicas consiste em ver o que todos viram e pensar no que ninguém pensou".

Albert Szent-Gyorgyi (1893-1986), Bioquímico Húngaro

“E Jesus disse-lhe: se tu poderes , tudo é possível ao que crê”.

Marcos 9:23

Índice

RESUMO	ix
ABSTRACT	x
LISTA DE FIGURAS	xi
LISTAGEM DOS QUADROS	xii
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	xiii
1- INTRODUÇÃO.....	1
1.1- Considerações sobre os <i>Staphylococcus aureus</i>	1
1.1.2 Impacto clínico.....	4
1.1.3-Fatores de virulência de <i>S.aureus</i>	5
1.2- Considerações sobre os antibióticos–Ampicilina.....	7
1.3- Considerações sobre os Antissépticos com destaque para as moléculas de Polihexametileno Biguanida (PHMB).....	11
2 JUSTIFICATIVA	15
3 OBJETIVO	16
4 MATERIAIS E MÉTODOS	17
4.1- Definição das amostras bacterianas utilizadas neste TCC.....	17
4.2- Ativações das amostras bacterianas.....	17
4.3- Contagem de UFC em 10 µL por diluição seriada na base10, de10 ⁻¹ a 10 ⁻⁸	17
4.4 Cálculo para definir a quantidade de moléculas de PHMB presentes em 10µL de uma solução diluída a partir da concentração 0,2%.....	18
4.5 - Testes da avaliação germicida das moléculas de PHMB.....	19
4.5.1- Diluição das moléculas de PHMB.....	19
4.5.2- Teste da ação germicida com PHMB.....	19
4.5.3- Fórmula para calcular a área em cm ²	20
4.5.4 - Testes de exposição dos <i>S. aureus</i> aos efeitos das moléculas de PHMB, por 30 minutos.....	21
4.6- Teste com antibiótico.....	22
4.6.1- Cálculos teóricos para definição das concentrações de Ampicilina utilizadas nos testes para avaliação da Relação antibiótico- bactéria.....	22
4.6.2- Ensaio quantitativo da relação entre número de moléculas de antibióticos disponíveis para cada bactéria num halo de inibição.....	22
5 RESULTADOS	24
5.1 - Preparo e quantificação das amostras bacterianas.....	25
5.2- Resultados dos estudos com PHMB.....	25
5.2.1- Procedimentos teóricos com PHMB.....	26
5.2.2-Resultados do teste da ação germicida com amostras não lavadas.....	26
5.2.3 - Teste da ação germicida em células Lavadas.....	28
5.2.4- Teste Germicida em 30 minutos.....	31
5.3. -Teste com antibiótico - Ampicilina.....	32
5.3.1 - Procedimentos teóricos com a Ampicilina.....	32
5.3.2 - Procedimentos Experimentais com a Ampicilina.....	33
6 DISCUSSÃO	36
6.1 - Sobre o preparo e quantificação das amostras bacterianas.....	36
6.2- Moléculas de PHMB presentes em 10µL.....	36
6.2.1 - Procedimentos teóricos com PHMB.....	36
6.2.2- Ensaio de PHMB com amostras bacterianas não lavadas.....	37
6.2.3-Ensaio de PHMB com amostras bacterianas lavadas.....	37
6.2.4- Teste da Interação PHMB - bactéria, por 30 minutos.....	37
6.3 - Procedimentos com Ampicilina.....	38

6.3.1- Procedimentos teóricos com Ampicilina.....	38
6.3.2-Procedimentos experimentais com Ampicilina.....	38
7 CONCLUSÕES.....	39
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	40

RESUMO

MARISA DE FATIMA COSTA SOUZA

Avaliação Quantitativa da Interação das Moléculas de Polihexametileno Biguanida e de Ampicilina com as Células de *Staphylococcus aureus*

Orientador: Prof. Maulori Curié Cabral

Resumo da Monografia apresentada no Instituto de Microbiologia Paulo de Góes da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas: Microbiologia e Imunologia e aprovação no RCS Trabalho de Conclusão de Curso.

O objetivo deste trabalho foi estabelecer uma metodologia para estudar, de forma quantitativa, a interação das moléculas do antisséptico Polihexametileno Biguanida (PHMB) e do antibiótico Ampicilina, com as células de *Staphylococcus aureus* (cepa BMB 9393, resistente à Meticilina e a cepa 30, sensível à Ampicilina). Usando-se procedimentos teóricos e experimentais pôde ser estimado, através de cálculos matemáticos, o número de moléculas de um antisséptico e de um antibiótico que geravam o halo de inibição de crescimento, nas culturas bacterianas efetuadas em placas de Petri com o meio Agar Triptona Extrato de Levedura. Usando-se a área média ocupada por uma célula de *S.aureus*, como uma Unidade de Equivalência de Área (UEA) foi possível calcular a quantidade de moléculas de PHMB suficiente para interagir com uma única UFC no ambiente do halo de inibição do crescimento. Estimativamente, $3,61 \times 10^6$ foi a quantidade mínima de moléculas de PHMB para matar uma única célula de *S. aureus*. Essa suposição é possível pelo fato das moléculas de PHMB cobrirem a área do halo como um manto. Essas moléculas interagem com os resíduos aniônicos que estão presentes do ambiente do halo e, quando interagem, ficam presas e não difundem. Nos ensaios com antibiótico, os procedimentos teóricos e experimentais permitiram definir apenas o números de moléculas de Ampicilina que estavam disponíveis para cada células bacteriana. Essa limitação é provocada pelo fato das moléculas dos antibióticos serem difusíveis na superfície do meio de cultura. Os cálculos da interação antibiótico-bactéria mostraram que 886.279.492 moléculas foram disponibilizadas para cada uma das células bacterianas que estavam presentes no halo de inibição. Reconhecidamente, há limitações no método usado para medir o diâmetro da zona de inibição do crescimento. Dessa forma, os resultados numéricos encontrados podem ser considerados somente como previsíveis. Com as hipóteses empregadas e os resultados obtidos neste trabalho espera-se contribuir para uma melhor compreensão sobre a ação dos agentes antibacterianos.

Palavras Chaves: 1- Interação antibiótico-bactéria; 2 - Interação antisséptico-bactéria; 3- Polihexametileno Biguanida; 4-MRSA; 5- Inibição do crescimento bacteriano.

ABSTRACT

MARISA DE FATIMA COSTA SOUZA

Avaliação Quantitativa da Interação das Moléculas de Polihexametileno Biguanida e de Ampicilina com as Células de *Staphylococcus aureus*

Orientador: Prof. Maulori Curié Cabral

Resumo da Monografia apresentada no Instituto de Microbiologia Paulo de Góes da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas: Microbiologia e Imunologia e aprovação no RCS Trabalho de Conclusão de Curso.

This work aimed to establish a methodology to study, quantitatively, the interaction of antiseptic Polyhexamethylene Biguanide (PHMB) and antibiotic ampicillin molecules with *Staphylococcus aureus* cells (strain BMB 9393, resistant to methicillin, and strain 30, sensitive to ampicillin). It was possible to estimate using theoretical and experimental procedures and mathematical calculations, the number of molecules of an antiseptic and an antibiotic that caused the growth inhibition halo in bacterial cultures carried out in Petri dishes with Tryptone Yeast Extract Agar medium. Using the average area occupied by *S.aureus* cell as an Area Equivalence Unit (UEA) it was possible to calculate the amount of PHMB molecules that interacted with a single CFU in the environment of the growth inhibition zone. According to our methodology, $3,61 \times 10^6$, were the minimum amount of PHMB molecules to kill a single *S. aureus* cell. This assumption was made possible by the fact that PHMB molecules cover the inhibition zone area like a cloak. These molecules interact with the anionic residues that are present in the inhibition zone environment and become trapped and do not diffuse after interaction. In antibiotic assays, the theoretical and experimental procedures allowed to define only the numbers of ampicillin molecules that were available for each bacterial cell. This limitation is caused by the fact that antibiotic molecules are diffusible on the surface of the culture medium. Antibiotic-bacterial interaction calculations showed that 886,279,492 molecules were made available for each bacterial cell that was present in the inhibition zone. Admittedly, there are limitations to the method used to measure the diameter of the growth inhibit zone. Thus, the numerical results found can only be considered as predictable. With the hypotheses employed and the results obtained in this work, it is expected to contribute to a better understanding about the action of antibacterial agents.

Keywords: 1- Antibiotic-bacterial interaction; 2 - Antiseptic-bacterial interaction; 3- Polyhexamethylene Biguanide; 4-MRSA; 5- Inhibition of bacterial growth.

LISTA DE FIGURAS

Pag.

1	Imagem de Staphylococcus aureus, com destaque para barra de dimensão de 1,6cm	5
2	Frasco de penicilina produzido pelo Laboratório Abbott, numa exposição sobre a vida e obra do químico Alfred Nobel.	7
3	Figuras a e b representação esquemática da estrutura química da Penicilina.....	8
4	Estrutura química da penicilina e da ampicilina.....	9
5	Mostra da similaridade estrutural da penicilina com a ampicilina, Indicada pela faixa vermelha.....	10
6	Esquema representativo do mecanismo de ação da Penicilina.....	11
7	Figura 7a modelo esquemático de uma estrutura monomérica das moléculas de PHMB.....	12
	Figura 7b modelo esquemático comparativo da estrutura do núcleo biguanidicos e do aminoácido Arginina.....	13
	Figura 7c unidade molecular do antisséptico PHMB, onde n= 10 a 13 núcleos biguanidílicos.	13
8	Esquema de diluição seriada base 10^{-1} a 10^{-8} . Esquema de contagem de UFC numa placa de Petri.....	24
9	Resultado para definição preliminar do efeito das moléculas de PHMB contidas em $10\mu\text{L}$ da solução, sobre os Staphylococcus aureus amostra 30, com atenção especial à diluição do germicida que promove a morte de todas as UFC existentes no halo de inibição.....	26
10	Figura a suspensão lavada teste, figura b suspensão não lavada controle.....	28
11	Resultado do teste de antibiose onde a preparação de S. aureus, amostra 30, frente as concentrações de ampicilina, nas concentrações de 10 e $1\mu\text{g}/10\mu\text{L}$. Cada cm^2 da placa continha 3.067.583 UFC.....	34

LISTAGEM DOS QUADROS

Pag.

1- Algumas espécies de <i>Staphylococcus</i> de origem humana.	2
2- Cálculo para definição do número de moléculas de Polihexametileno Biguanida, por 10 μ L, usada em cada ensaio.	25
3- Complemento da figura 11 mostrando a quantidade de moléculas de PHMB que ocupa uma área equivalente a uma célula de <i>S. aureus</i> a relação entre o número de Áreas equivalentes e o número de UFC que ocupava a área do halo.	27
4- Ação das moléculas de Polihexametileno Biguanida, em diferentes concentrações, frente a uma população de <i>S. aureus</i> BMB 9393 contendo 3000.000,000 UFC/mL.	28
5- Conjunto de experimentos de células lavadas e não lavadas, mostrados nos Quadros 5a, 5b e 5c conjunto de resultados dos experimentos práticos e teóricos utilizados para determinar o número provável de moléculas de PHMB que é necessários para matar uma única células de <i>S. aureus</i> BMB 9393 em preparação lavada e não lavada.	29
6- Resultado da Interação de Polihexametileno Biguanida com as células de <i>S. aureus</i> BMB 9393, durante 30 minutos.	32
7- Cálculos para definição do número de moléculas de antibióticos usado em cada ensaio de <i>S. aureus</i> amostra 30.	33
8 - Quantidade média de moléculas de ampicilina disponível para cada células de <i>S. aureus</i> , nos diferentes testes.	35

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- 1- ATEL - Agar triptona extrato de levedura
- 2-ANVISA- Agência Nacional de Vigilância Sanitária
- 3-AVC- Acidente vascular cerebral
- 4-AES- Área equivalente a *Staphylococcus aureus*
- 5-BMB- Clone Epidêmico Brasileiro
- 6- CDC- Centro de Controle e Prevenção de Doenças
- 7-ETA- Serina protease
- 8-ETB- Serina protease
- 9-FC- Região constante da Imunoglobulina
- 10-IgG- Imunoglobulina
- 11-IPPMG- Instituto de Pediatria e Puericultura Martagão Gesteira
- 12-*MecA*- Gene cromossômico
- 13-MRSA- *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina
- 14-NaCl- Cloreto de sódio
- 15-PBP- Proteína ligadora de penicilina
- 16-PBS- Solução salina tamponada com fosfato
- 17-PHMB- Polihexametileno biguanida
- 18-SCCmec- Elemento genético móvel
- 19- UAE - Unidade de área de equivalência
- 20- UFC- Unidade formadora de colônias
- 21- UNIFESP- Universidade Federal de São Paulo
- 22- UFRJ- Universidade Federal do Rio de Janeiro
- 23- UTI- Unidade de Terapia Intensiva

INTRODUÇÃO

1.1. Considerações sobre os *Staphylococcus aureus*

Os *Staphylococcus aureus* foram descritos pelo médico Alexander Osgston em 1880. Desde então a espécie é considerada como sendo um patógeno com capacidade para provocar infecções que podem ser superficiais, como furúnculo e impetigo ou generalizadas, que podem atingir o coração, ossos, rins, cérebro, pulmões, fígado, ou mesmo gerar a síndrome do choque térmico (Kim *et al.*, 1989).

Segundo Santos *et al.*, (2007) o gênero *Staphylococcus* está incluído na família *Staphylococcaceae*, e é formado por cocos Gram positivos, medindo aproximadamente 0,5 a 1,5 µm de diâmetro. São imóveis, não esporulados e, geralmente, não encapsulados. No gênero *Staphylococcus* são conhecidas 52 espécies sendo 29 associadas à microbiota humana (Moraes, 2019).

De acordo com Cordeiro (2004), os critérios clássicos para a caracterização da espécie *S. aureus* envolvem o crescimento em meio de Chapman (Agar Manitol com 7,5% de NaCl), de caráter seletivo em razão da alta salinidade, e que revela a fermentação do manitol, com produção de ácido, complementados com os testes de produção de coagulase e de catalase. Entretanto, Segundo Gandra *et al.*, (2008), consideram que o uso de testes bioquímicos, para identificação e biotipagem bacteriana podem gerar resultados variáveis em decorrência de fatores ambientais sobre a expressão gênica.

Por outro lado, a adoção de técnicas moleculares tem apontado os MRSA como um dos principais patógenos hospitalares. Os *S.aureus* nosocomiais são um tipo de patógeno resistente à meticilina e cuja capacidade de causar infecções está intimamente ligada com a expressão de genes de virulência que codificam moléculas associadas à colonização, dano tecidual às células do hospedeiro e formação de biofilme (Botelho *et al.*, 2019).

No quadro 1 estão destacadas 16 das espécies de *Staphylococcus* que fazem parte da microbiota humana. Embora as bactérias da espécie *S. aureus* sejam consideradas por Almeida *et al.*(2014) como sendo possíveis patógenos oportunistas, frequentemente, têm sido associadas com situações de comprometimento nosocomial (Botelho *et al.*, 2019), por isso foi a espécie escolhida para os ensaios neste trabalho.

Quadro 1- Lista das espécies de *Staphylococcus* de origem humana correlacionadas com os aspectos clínicos resultantes das infecções

Espécies de <i>Staphylococcus</i> de origem humana e os aspectos clínicos resultantes das infecções.	
Espécies	Correlação com os aspectos clínicos
<i>S. aureus</i>	É o patógeno humano mais importante entre os estafilococos. Coloniza 20 a 40% dos adultos, sendo encontrado principalmente em narinas anteriores.
<i>S. epidermidis</i>	Relacionado com infecções associadas ao uso de cateteres endovenosos e endocardites, entre outras.
<i>S. saprophyticus</i>	Causa infecções urinárias agudas, sobretudo em mulheres jovens, saudáveis e sexualmente ativas.
<i>S. haemolyticus</i>	Presente na microbiota humana normal da pele. Relatos de resistência aos glicopeptídeos.
<i>S. warneri</i>	Presente na microbiota humana normal da pele.
<i>S. hominis</i>	É encontrado na pele humana e relacionado à bacteremia em pacientes imunodeprimidos.
<i>S. simulans</i>	Encontrado na pele e uretra de mulheres sadias.
<i>S. lugdunensis</i>	Associado a casos de endocardite.
<i>S. schleiferi</i>	Relacionado a várias infecções em humanos.
<i>S. pasteurii</i>	Não relacionado a infecções em humanos.
<i>S. auricularis</i>	Raras vezes implicada em infecções em humanos.
<i>S. cohnii</i>	Presente na microbiota humana normal da pele.
<i>S. xylosum</i>	Raras vezes implicado em infecções em humanos.
<i>S. saccharolyticus</i>	Raras vezes implicado em infecções em humanos.
<i>S. caprae</i>	Originalmente isolada de caprinos e recentemente encontrada em pele humana.
<i>S. pulvereri</i>	Raras vezes implicado em infecções em humanos.

http://www.anvisa.gov.br/servicosade/controle/rede_rm/cursos/boas_praticas/modulo4/objetivos.htm

O reconhecimento dos *Staphylococcus aureus* resistentes à metilina MRSA por Enright *et al.*, (2002), suscitou a compreensão sobre a necessidade do uso de antissépticos eficientes como os principais recursos para o controle das infecções no ambiente hospitalar.

Epidemiologicamente, os *S. aureus* são apontados como causa frequente nas infecções em pacientes submetidos à diálise peritoneal (Figueiredo *et al.*, 2013). Além disso, têm ampla distribuição na natureza, comprometendo não só os seres humanos, mas também podem ser encontrados em animais e em alimentos. Estudo realizado por (Cerqueira e Almeida, 2013) relata o isolamento de linhagens de MRSA a partir de alimentos de origem animal, incluindo carne suína, bovina, frango, além de queijo, leite e outros derivados bovinos

O percentual de portadores de *S. aureus* na cavidade nasal é mais significativo em pessoas que trabalham em hospitais. Estudos realizados por (Silva *et al.*, 2012 e Hanson, 2018), em profissionais de saúde sugerem que 20% a 30% desses profissionais estejam colonizados por esse tipo de bactéria e afirmam que, indivíduos assintomáticos, colonizados por *S. aureus*, podem espalhar esses micróbios em seu ambiente de trabalho e assim contribuir para colonização de novos indivíduos suscetíveis (Peres e Zanusso, 2011).

Isolamento e identificação de *Staphylococcus aureus* em fossas nasais e mãos de profissionais da saúde no Hospital Santa Lúcia em Maringá-PR detectaram que as mãos e, fossas nasais dos profissionais da saúde aumentam a probabilidade na transmissão de patógenos no ambiente hospitalar. Devido à alta taxa de mortalidade no Brasil por infecção hospitalar causada por *Staphylococcus aureus* há vários estudos, sobre contaminação durante a permanência nos centros de tratamentos, (Sales *et al.*, 2006)

No corpo humano, os *Staphylococcus aureus* podem ser encontrados na pele e mucosas, principalmente, na região anterior das narinas (Almeida, 2014). Segundo alguns autores, (Santos *et al.*, 2007 e em Anvisa, 2013,), os *Staphylococcus aureus* encontrados nas fossas nasais, garganta, axilas, trato intestinal e pele foram considerados, predominantemente, como agentes simbióticos em pacientes assintomáticos. Entretanto, em estudo efetuado no âmbito hospitalar, por Svidzinski *et al.*, 2007, são encontrados com frequência e os autores destacam a ocorrência de *S.aureus* como membros da microbiota humana, que estão associados com quadros patogênicos resistente à meticilina. Um estudo feito em 2017 foi estimado 119.247 infecções da corrente sanguínea por *S. aureus* com 19.832 mortes associadas (Kourtis, 2019).

Nos Estados Unidos em 2017 mais de 119.000 pessoas sofreram infecções por *Staphylococcus aureus* na corrente sanguínea e quase 20.000 morreram, de acordo com um novo relatório de Sinais

Vitais divulgado pelo, (CDC). A resistência bacteriana aumenta os custos com o tratamento antimicrobiano, e aumento no tempo de permanência nas unidades de terapia.

Além de acometer humanos, os *S. aureus* também são, frequentemente, envolvidos com os casos de mastite, em bovinos, (Rossi, 2016; Demeu *et al.*, 2017). A mastite se caracteriza como uma infecção da glândula mamária, que por sua vez provoca alterações físicas, químicas e bacteriológicas no leite e/ou alterações no tecido glandular das fêmeas lactantes (Oliveira *et al.*, 2011). A disseminação do *S.aureus* e a resistência aos antimicrobianos são os pontos principais na dificuldade do controle e eliminação dos mesmos.

1. 1. 2 Impacto clínico:

Segundo Harkins *et al.*, 2007; Liu *et al.*, 2016; Anvisa, 2019 e Gagetti, *et al.*, 2019, a disseminação dos patógenos bacterianos resistentes a medicamentos representa uma grande ameaça à saúde global. É amplamente reconhecido que o uso disseminado de antibióticos relaciona mecanismos de resistência que desencadeiam o aparecimento de cepas resistentes. Os *S.aureus* resistentes à meticilina (MRSA) foram observados pela primeira vez em 1960, menos de um ano após a introdução deste antibiótico beta-lactâmico de segunda geração na clínica. Logo depois, foi demonstrado que essa resistência era decorrente do gene *mecA*, codificador da resistência à meticilina, que está associado ao cassete cromossomo de estafilocócico (SCCmec) no qual pode ser transferido horizontalmente para uma cepa de *Staphylococcus aureus* sensível.

Menegotto e Picoli, (2007), afirmam que houve um aumento na ocorrência de cepas de *Staphylococcus aureus* oxacilina resistente (MRSA): adquiridas na comunidade (CA-MRSA), e a importância da pesquisa e descolonização em hospital. A descolonização segundo um estudo feito por (Oliveira, 2012), não recomenda a descolonização dos pacientes, pela possibilidade de favorecer a ocorrência de resistência bacteriana no ambiente hospitalar.

As toxinas liberadas por *S.aureus* nos alimentos causam infecção intestinal acompanhadas de vômitos e diarreia como os principais sinais após a ingestão de alimentos contaminados (Dias *et al.* 2011). Por isso, Murray *et al.*, (2016) afirmam que alimentos devem ser manipulados com os devidos aparatos de proteção, como: luvas, vestimenta cobrindo os braços, touca e máscara.

Dessa forma evita que manipuladores, portadores da bactéria em secreções nasofaríngeana e com ferimentos ou abscessos nas mãos, contaminem o alimento. Produtos que não foram cozidos ou refrigerados, adequadamente, possibilitam o crescimento bacteriano e a produção de toxinas (Morais, 2019).

A imagem na (Figura 1), que apresenta a função da escala da ampliação, mostra-se como modelo de referência para uma definição mais acurada da dimensão das células de *S. aureus*: Nessa imagem, cada μm está ampliado para 1,6cm, fornecendo a dimensão relativa das células de *S.aureus*. As células mostradas nessa Imagem foram escolhidas para uso nos cálculos usados na interação quantitativa das moléculas de agentes germicidas com essas bactérias.

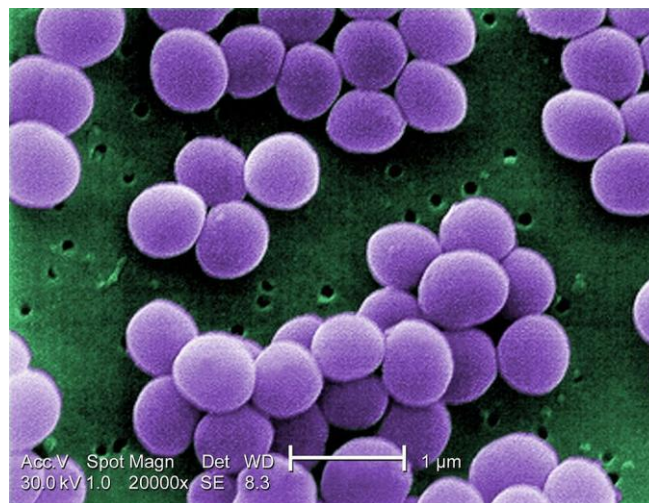


Figura 1- Imagem de *S. aureus*, com destaque para a barra de dimensão da figura, onde cada μm corresponde a **1,6 cm**, obtida do link:

https://www.google.com/search?q=staphylococcus+aureus&source=lnms&tbn=isch&sa=X&ved=0ahUKEwiJvfrVyyYrjAhX_H7kGHYpsB_kQ_AUIECgB&biw=1280&bih=657

1.1.3- Fatores de virulência de *S.aureus*

Conforme comunicação pessoal da Dra. Agnes Figueiredo (2019) a definição sobre os fatores de virulência dos *S. aureus* envolve uma gama de fatores, com destaque para a grande variação genética das estirpes e a influência exercida pelas fatores ambientais.

Considerando as toxinas produzidas como proteínas secretáveis ou fixadas à superfície das

bactérias que apresentam atividade prejudicial para as células humanas, cabe destacar os seguintes elementos: peptidoglicano; proteína A e as enzimas extracelulares como hemolisinas, adesinas e leucocidinas, como alguns dos fatores de virulência encontrados neste gênero bacteriano.

A seguir estão apresentadas as características de alguns desses fatores:

- Proteína A: presente na parede celular do *S. aureus*. Ela se liga a anticorpos circulantes da classe IgG, pela sua região constante Fc, neutralizando a sua função, impedindo a adesão de imunoglobulinas e não permitindo a ativação do complemento, (Hodille *et al.*, 2017)

Toxina alfa: forma poros na membrana das células destruindo-as. É frequente ter ação sobre as células de músculo liso vascular, mas pode danificar qualquer tipo de célula, como eritrócitos, (De Moraes, 2011).

- Toxina beta ou esfingomielase C: hidrolisam determinados lipídios, como esfingomielina e lisofosfatidilcolina, da membrana celular de células. Alguns tipos celulares são degradados por essa toxina, (De Moraes, 2011).

- Toxinas esfoliativas: presentes nas estirpes (5-10%) que causam síndromes esfoliativas da pele. Há duas formas ETA e ETB (toxinas esfoliativas A e B). São serina proteases que destroem os desmossomas que unem as células da pele umas às outras, resultando em perda da camada superior da pele com subsequente esfoliação (Corredor *et al.* 2012)

- Enterotoxinas (Minor e Marth, 1972), resistentes aos sucos gastrointestinais, são produzidas por 30-50% das estirpes de *S. aureus* (Nader, 2007). Ativam o sistema imune, levando à produção de citocinas, causando danos aos tecidos.

- Toxina da síndrome de choque: é um superantígeno, ativa de forma não específica os linfócitos, gerando reações imunitárias inapropriadas e danosas para o indivíduo.

No que tange às infecções graves associadas aos *S. aureus*, a Organização Mundial da Saúde incluiu a sepse como prioridade de saúde pública (Monteiro *et al.*, 2016).

No Brasil é extremamente alta a taxa de mortalidade decorrente dos casos de sepse em Unidade de Terapia Intensiva (UTI), taxa esta que excede até a de mortes por acidente vascular cerebral (AVC) ou infarto cardíaco. Nestas unidades. Segundos levantamentos organizados por pesquisadores da Universidade Federal de São Paulo e do Instituto Latino Americano de sepse a

cada ano morrem mais de 230 mil pacientes adultos nas UTIs, em consequência da doença (Unifesp, 2019). O tratamento inadequado com antibióticos contribui com o risco de morte nos pacientes graves (Luna *et al.* 2010).

1.2-Considerações sobre os antibióticos–Ampicilina

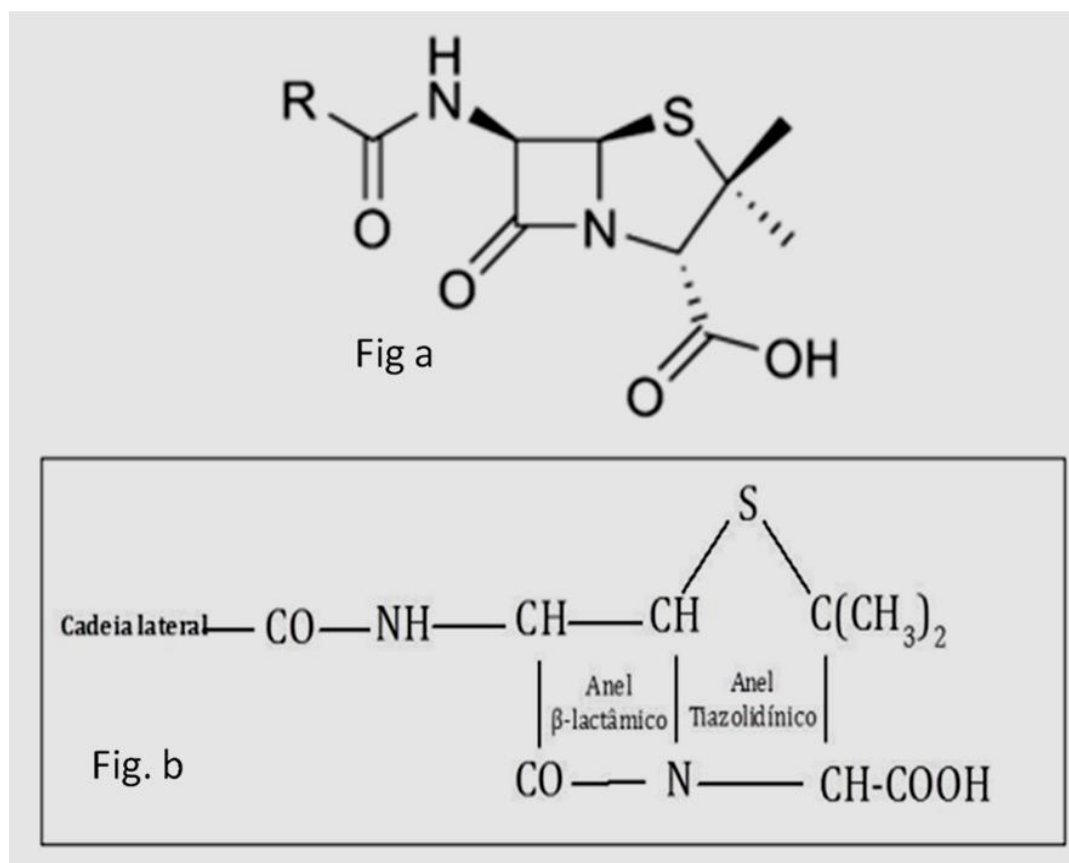
Os antibióticos são medicamentos utilizados para o tratamento de infecções bacterianas. A primeira descrição de um antibiótico, a penicilina, foi feita por Alexander Fleming, em 1928, resultante da observação de uma inibição do crescimento bacteriano, mediada por fungos do gênero *Penicillium*. Mas, somente a partir do início da década de 1940 começou a ser utilizado em larga escala.

Figura 2 apresenta um frasco de penicilina produzido pelo Laboratório Abbott, numa exposição sobre a vida e obra do químico Alfred Nobel e nas Figuras 3a e 3b estão apresentadas as imagens esquemáticas da estrutura química da Penicilina



Figura 2 - Frasco de penicilina produzido pelo Laboratório Abbott, numa exposição sobre a vida e obra do químico Alfred Nobel, na Fundação Getúlio Vargas, no Rio de Janeiro (Tomaz Silva/Agência Brasil).

<https://pt.wikipedia.org/wiki/Penicilina>



Figuras 3a e3b. Imagens esquemáticas da estrutura química da Penicilina, obtida do link: <<https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/8/82/Penicillin-core.png/200px-Penicillin-core.png>>.

O uso frequente da penicilina desencadeou, inicialmente, o aparecimento de cepas bacterianas resistentes, atribuídas à produção de beta-lactamases, enzimas que degradam o anel β -lactâmico da penicilina. Esse fenômeno acarretou a busca por novas moléculas de penicilinas semissintéticas (Silveira *et al.*, 2006). De acordo com Tortora (2016, p. 558), o objetivo de resolver o problema do espectro restrito de atividade das penicilinas naturais, as penicilinas semissintéticas foram desenvolvidas.

A vancomicina, um antimicrobiano glicopeptídeo, é o agente mais amplamente utilizado no tratamento de infecções graves causadas por patógenos gram-positivos como *Staphylococcus aureus*. Esse antimicrobiano foi obtido do organismo *Streptomyces orientalis* (Jones *et al.*, 2006). A vancomicina é utilizada na prática clínica. No entanto, nos últimos anos tem ocorrido aumento nas taxas de falência terapêutica da vancomicina. Algumas situações clínicas podem alterações

como a sepse, a insuficiência renal como consequência o paciente necessita ser submetido a hemodiálise (Almeida, 2011).

Várias pesquisas na ciência estão direcionadas ao reconhecimento da biodiversidade de novos produtos naturais com atividade antimicrobiana (Filho *et al.*, 2014), a especialização de recursos nas áreas da biologia molecular e das engenharias biológicas é essencial para o desenvolvimento de novos antimicrobianos (Guimarães *et al.*, 2010).

Figura 4 mostra a correlação estrutural entre a penicilina natural e a ampicilina.

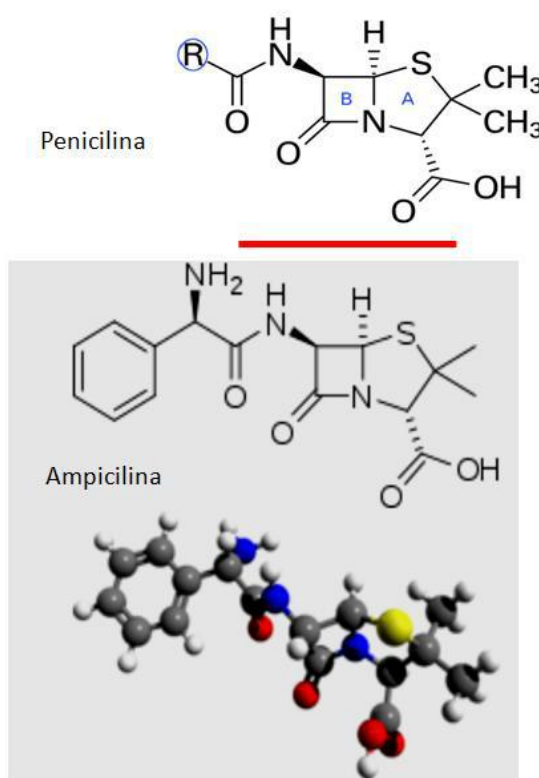


Figura 4-Estrutura química da penicilina e ampicilina. Notar a similaridade estrutural da penicilina com a ampicilina, indicada pela faixa vermelha. Imagem obtida no Link: <https://pt.wikipedia.org/wiki/Ampicilina>

Segundo Sutherland e Rolinson (1964), quimicamente, a Ampicilina é definida como Ácido 6 [D (-) aminofenilacetamido] penicilânico, é uma penicilina de amplo espectro de atividade, estável em pH ácido, por isso, passível de administração oral, atingindo concentrações séricas satisfatórias com baixa toxicidade.

A ampicilina é uma molécula do grupo das aminopenicilinas, no qual também está incluída a amoxicilina, que difere da penicilina apenas pela presença de um grupo amino. Como a penicilina, a ampicilina é suscetível às β -lactamases, que hidrolisam o anel β -lactâmico.

Como molécula semissintética, a ampicilina é gerada a partir da Benzilpenicilina, conforme mostrado na figura 5

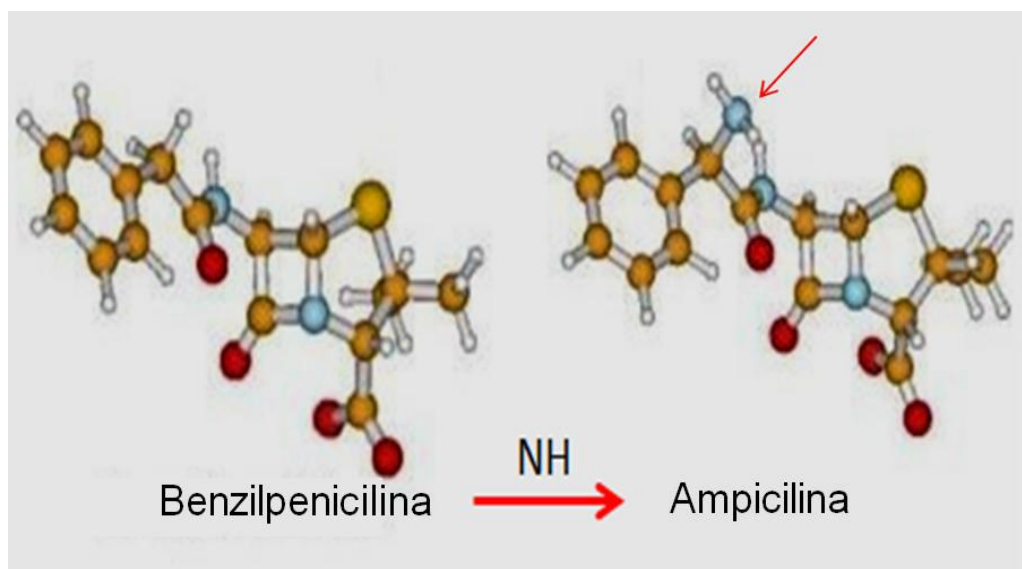


Figura 5. Obtida do link: https://www.researchgate.net/figure/Figura-2-Representacion-de-las-estructuras-tridimensionales-obtenido-das_fig2_26851707

A penicilina G, ou Benzilpenicilina, foi descrita em 1929 como agente antibiótico, porém somente foi introduzida como agente terapêutico nos anos 1940. Após o processo de industrialização da penicilina, especialmente em consequência da Segunda Guerra Mundial, foi observado um rápido crescimento na descoberta e desenvolvimento de novos antibióticos (Guimarães, 2010)

Funcionalmente, as moléculas dos antibióticos beta-lactâmico (penicilinas e cefalosporinas) interferem na síntese do peptidoglicano que é o componente essencial da parede celular bacteriana e se encontra externamente na membrana citoplasmática das bactérias. Segundo Azevedo (2014), as moléculas dos antibióticos beta-lactâmico atuam como inibidores na fase final da biossíntese do peptidoglicano, devido à similaridade estrutural entre o anel beta-lactâmico e o arranjo molecular da região dos tetrapeptídeos recém-formados.

Isso justifica porque essa classe de antibióticos consegue inibir, irreversivelmente, as D-D-carboxitranspeptidases, conhecidas por PBP's (*penicillin binding-proteins*), impedindo assim a formação entre as cadeias peptídicas de peptidoglicano (Suarez e Gudiol, 2009). A síntese dos peptidoglicano ocorre durante a fase de crescimento celular. Assim sendo, para que os beta-lactâmicos exerçam a atividade, é necessário que as bactérias se encontrem em fase de duplicação,

visto que é neste momento que há a produção de parede celular. Conclui-se assim que esta classe de antibióticos não é útil em situações onde a população bacteriana se encontra em fase estacionária de crescimento (Azevedo, 2014).

Os antibióticos são medicamentos amplamente utilizados para tratar infecções causadas por bactérias, mas algumas cepas apresentam resistência aos antimicrobianos. As bombas de efluxo ativo atuam como um mecanismo de resistência, removendo o antibiótico do seu local de ação antes que possa atuar. As bactérias também são capazes de destruir os antibióticos betas lactâmicos devido à produção das betas lactamases que têm a capacidade de inativar alguns desses antibióticos e podem atingir altas concentrações, (Guimarães *et al.*, 2010; Azevedo, 2014). Como efeito ilustrativo, a figura 6 mostra o sitio de ação das PBPs.

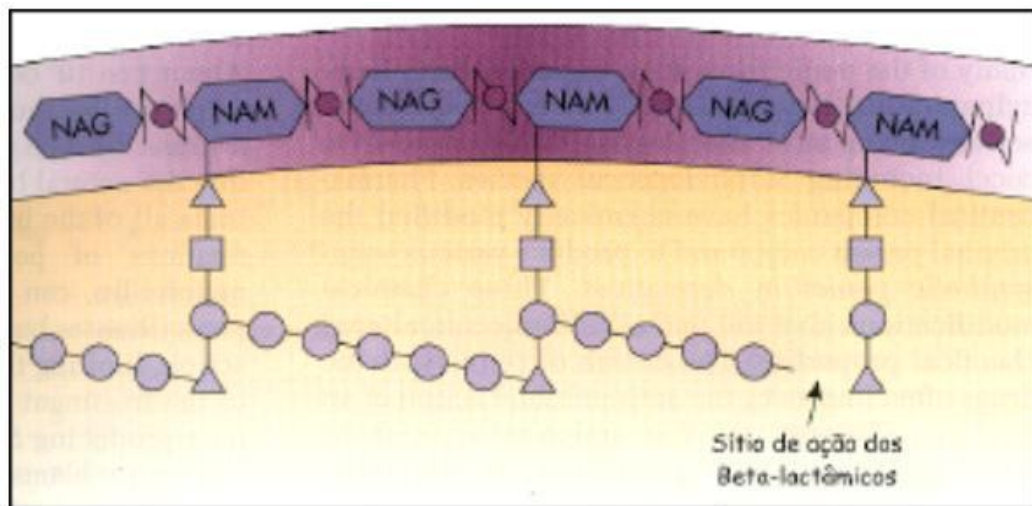


Figura 6- Esquema representativo do mecanismo de ação da Penicilina. Obtida no <<https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/8/82/Penicillin-core.png/200px-Penicillin-core.png>>.

1.3- Considerações sobre os Antissépticos com destaque para as moléculas de Polihexametileno Biguanida (PHMB)

Antissépticos são antimicrobianos usados para impedir a proliferação microbiana em tecido íntegro ou que tenha sofrido alguma injúria acidental ou cirúrgica. Os antissépticos têm sido aliados na estratégia utilizada na limpeza de feridas ou como prevenção contra possíveis contaminações. Antissepsia consiste na utilização de produtos microbicidas ou microbiostáticos sobre a pele ou mucosa, com objetivo de reduzir a carga microbiana em sua superfície (Moriya e Módenaou, 2008).

Como o intuito deste estudo está focado, principalmente, nas moléculas de Polihexametileno Biguanida, as descrições estão centradas nesse tipo de substância, que tem caráter catiônico e anfipático, no qual os núcleos catiônicos da cadeia principal, em razão da elevada basicidade que apresentam, são as responsáveis pela atividade microbica (**Figura 7**)

Segundo Fumarola (2011) as moléculas de PHMB apresentam-se como um polímero de grupos biguanídicos, intercalados por sequências de hexanos, que estão ligados a terminais que podem ser: aminas, guanidinas ou ciano-guanidinas. O cloridrato de Polihexametileno biguanida (PHMB-HCl) também denominado Polihexanida ou Poli-amino-propil-biguanida é um tipo de biocida de ação rápida sobre bactérias, fungos e leveduras, protozoários ou algas. As moléculas de PHMB apresentam estrutura química catiônica e anfipática resultante dos grupos biguanidílicos, conforme mostrado nas figuras 7a, 7b e 7c.

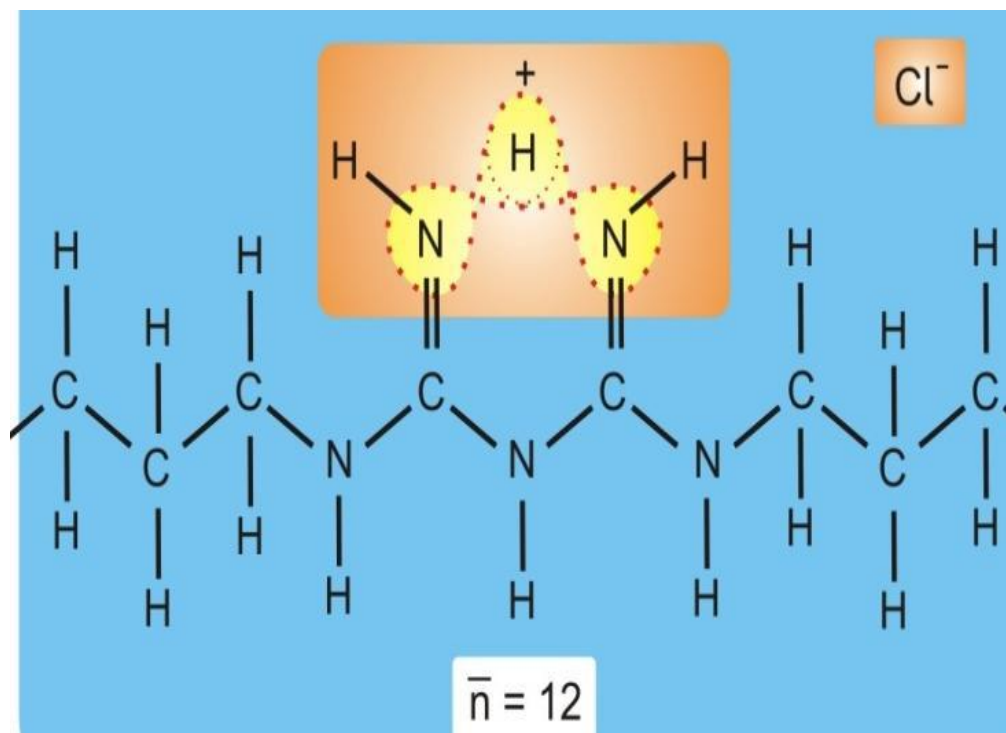


Figura 7a - Modelo esquemático de uma estrutura monomérica das moléculas de Polihexametileno Biguanida pós ionizada com ácido clorídrico (Acervo particular- MCCabral)

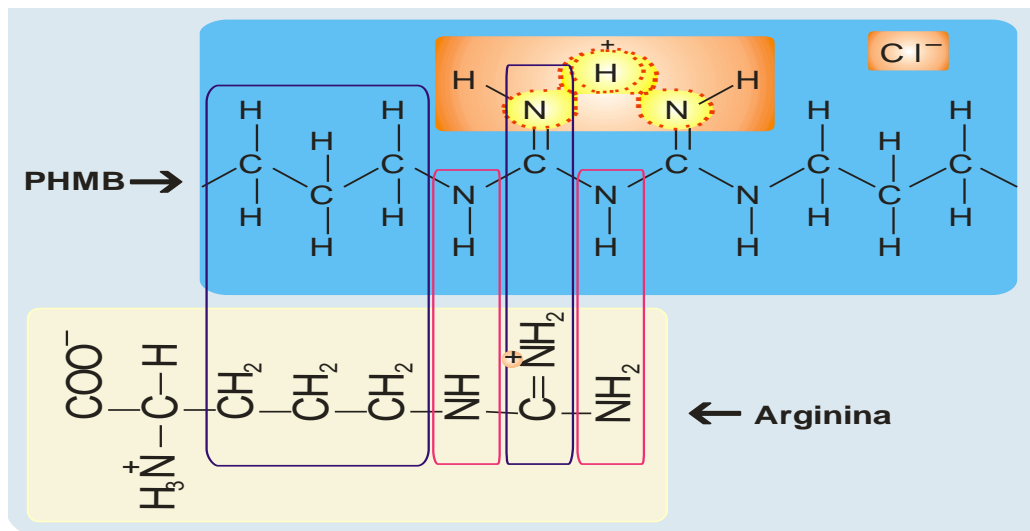


Figura- 7b - Modelo esquemático comparativo da equivalência molecular entre a estrutura do núcleo biguanídico e a estruturado do aminoácido Arginina. (Acervo particular- MCCabral)

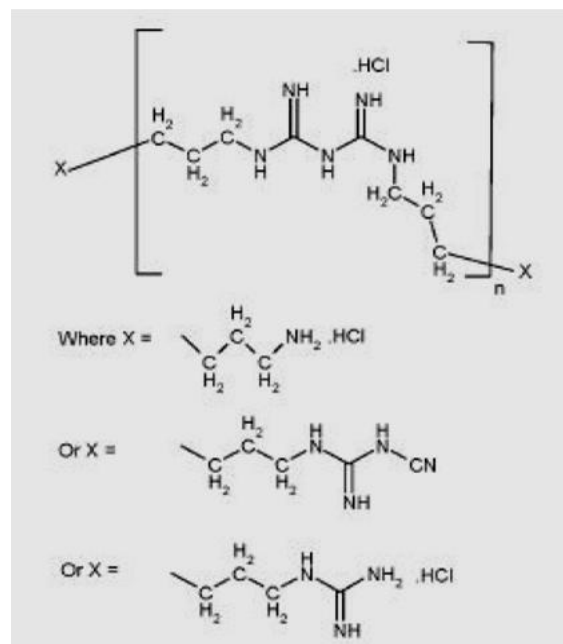


Figura 7c - Unidade molecular do antisséptico PHMB, onde $n= 10$ a 13 núcleos biguanídíflicos (Mashat, 2016)

O mecanismo de ação das biguanidas está baseado nas propriedades fortemente catiônicas e anfipáticas de suas moléculas. Ao interagirem com os componentes da superfície das bactérias ou outros tipos microbianos, reagem com as cargas elétricas negativas presentes nos poros responsáveis pela assimilação de cátions bivalentes. Trata-se de um mecanismo inespecífico na

superfície dos micróbios, que perturba o sistema celular tornando o microrganismo alvo incapaz de manter as suas funções (Cabral e Liberto, 2007).

As biguanidas, da classe das PHMB para uso geral, são constituídas por uma classe de antissépticos catiônicos poliméricos formados por uma mistura de diversas moléculas de Polihexametileno Biguanida (McDonnell, 2007). O PHMB vem sendo estudado há décadas (Rosenthal *et al.*, 1982) como ingrediente ativo em formulações de desinfetantes para Indústrias alimentícias. Ainda não há evidência que afirme que esse tipo de antisséptico selecione patógenos resistentes (Thomas *et al.*, 2009). Um estudo realizado por (Santos 2010), comprovou a eficiência da ação bactericida do Cloridrato de Polihexametileno Biguanida (PHMB), na desinfecção de indústrias cervejeiras.

Os estudos indicam que a Polihexametileno Biguanida é eficaz no tratamento de feridas colonizadas/infetadas, promovendo imediata cicatrização, amenizando a dor, quando esta é utilizada. (Santos e Silva, 2011; Kaehne Eberlein, 2008). A eficácia antimicrobiana da Polihexanida biguanida não é afetada pelo contato com fluidos, tecidos, sangue ou albumina o que é de suma importância para a prática clínica, (Hübner e Kramer, 2010).

2. JUSTIFICATIVA

Considerando que não foi encontrado na literatura estudos que mostrassem a relação quantitativa entre número de moléculas de germicidas e de células bacterianas mortas, foi desenvolvido este estudo, como uma forma inédita de experimento que, certamente, suscitará novos complementos para demonstrar o fenômeno com mais acuidade. Assim sendo, espera-se ainda que a ideia deste estudo germine e que outras pesquisas venham contribuir para melhor esclarecimento do fenômeno.

A pesquisa em questão envolveu três elementos do âmbito da Microbiologia: uma espécie de bactéria; um tipo de antisséptico e um tipo de antibiótico, visando a possibilidade de calcular a provável quantidade de moléculas de um agente germicida que é necessária para matar uma única célula bacteriana. No caso específico deste estudo, foram utilizadas duas linhagens da espécie *Staphylococcus aureus* (BMB 9393 e Amostra 30); um antisséptico (PHMB) e, como antibiótico, Ampicilina.

3. OBJETIVO

Para a execução do estudo foi formulado o seguinte objetivo:

Correlacionar, quantitativamente, consideradas as limitações experimentais, o número de moléculas de ampicilina e de PHMB necessárias para matar uma única célula bacteriana de *Staphylococcus aureus*.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

Os materiais utilizados, bem como a metodologia a ser empregada, estão apresentados a seguir.

4.1. Definição das amostras bacterianas utilizadas neste TCC:

Neste trabalho foram utilizadas duas amostras da espécie *Staphylococcus aureus*, sendo uma, caracteristicamente, resistente à meticilina e à ampicilina e outra, sensível à meticilina. Ambas oriundas da coleção do Departamento de Microbiologia Médica do Instituto de Microbiologia Paulo de Góes, gentilmente e respectivamente, cedidas pelas Professoras Bernadete Teixeira Ferreira Carvalho e Kátia Santos Neto.

Amostra Clone Epidêmico Brasileiro (*S.aureus* BMB 9393). Isolada em 1993 de um quadro de bacteremia. Local, Rio de Janeiro, Hospital Universitário Clementino Fraga Filho (UFRJ).

Amostra da comunidade (*S. aureus* 30), isolada em 2018 das fezes de um paciente do ambulatório pediátrico do Instituto de Puericultura e Pediatria Martagão Gesteira, IMPPG (UFRJ).

4.2. Ativação das amostras bacterianas

Das amostras obtidas, uma colônia foi transferida com uma agulha bacteriológica, para um tubo com rosca contendo 2mL de caldo simples, para isolar uma cultura pura. A cultura foi mantida em estufa a 37° C por 18h. Após esse período, foi retirada uma alíquota de 0,5 mL e transferida para um tubo com 4,5mL de caldo simples. Esse procedimento tem por finalidade colocar a população bacteriana em fase exponencial de crescimento. Essa nova suspensão bacteriana foi mantida por 2h em estufa a 37° C, sob agitação a cada 20 minutos.

4.3. Contagem de UFC em 10µL por diluição seriada na base10, de (10⁻¹ a 10⁻⁸).

Para contagem de UFC, 08 tubos foram marcados para receber as diluições de 10⁻¹ até 10⁻⁸. Todos os tubos de ensaio recebem 0,9mL de salina esterilizada e ao primeiro tubo foi adicionado 0,1mL da suspensão bacteriana ativada descrita no item 4.2. Este tubo foi homogeneizado com auxílio de um agitador (Vortex) por alguns segundos para gradual dispersão das células. Em seguida, 0,1mL dessa primeira diluição foi transferido para o tubo seguinte e agitado. Esse procedimento de diluição foi aplicado para os próximos tubos até atingir a diluição de 10⁻⁸. Para contagem das colônias foi usada uma placa de Petri, de 8,2 cm de diâmetro interno, contendo 20mL do meio de Cultura (Agar Triptona- Extrato de Levedura –ATEL (KASVI – Itália, Lote: 07126501). No fundo da placa era feita a marcação onde foram depositados os 10µL das respectivas diluições

bacterianas (10^{-1} a 10^{-8}), em duplicata. A placa foi incubada em estufa a 37°C , por 18h, para contagem das UFCs.

Como forma de preservar os resultados, ao final destes e dos demais experimentos, as placas foram fotografadas tendo como referência uma régua milimétrica.

Em relação às moléculas de PHMB, foram desenvolvidas as etapas de trabalho descritas a seguir:

4.4 Cálculo para definir a quantidade de moléculas de PHMB presentes em $10\mu\text{L}$ de uma solução diluída a partir da concentração 0,2%

No Brasil, os produtos comercializados como antissépticos à base de PHMB contêm 0,2% do princípio ativo.

Nos experimentos, a solução de PHMB a 0,2 % foi preparada a partir de uma solução comercial concentrada, fabricada e distribuída pela Lonza-ARCHÉ, com o nome de Cosmocil G, na concentração de 20%, que foi, gentilmente, cedida pela empresa Walkmed.

Considerando que as diluições de PHMB utilizadas estão na faixa de 2^{-1} a 2^{-8} , o quadro 2 apresenta a concentração Percentual e Molar do produto em cada diluição, inclusive, a quantidade de moléculas de PHMB presente em $10\mu\text{L}$ das diluições testadas.

Há limitação na definição do peso molecular das moléculas de PHMB, pois na literatura esse peso varia entre 2.300 e 3.100. (SCCS, 2017) em razão da quantidade de monômeros no polímero. Segundo McDonnell (2007) o peso molecular está em torno de 3.000. Para compensar essa margem de erro, nos cálculos do número de moléculas foi utilizado como peso molecular a média entre os dois valores, ou seja, 2.700;

Essas limitações abrem margem para novos experimentos que adotem parâmetros de medições mais acurados.

4.5. Teste da avaliação germicida das moléculas de PHMB

4.5.1 Diluição das moléculas de PHMB

Nos experimentos, usou-se a solução de PHMB a 0,2 %. No procedimento para diluição da preparação de PHMB, oito tubos foram marcados com as diluições na base 2, de 2^{-1} até 2^{-8} . Todos os oito tubos de ensaio recebem 0,5mL de solução salina esterilizada. Para a diluição, ao primeiro tubo com 0,5mL da salina foi adicionado 0,5mL da solução de PHMB a 0,2%, tubo este que foi homogeneizado com auxílio de um agitador (Vortex) por alguns segundos. Em seguida, 0,5 mL dessa primeira diluição foram transferidos para o tubo seguinte, que foi igualmente agitado. Esse procedimento de diluição foi aplicado para os próximos tubos até atingir a diluição de 2^{-8} . Baseado nas recomendações do Link.

https://www.blau.com.br/storage/app/media/bulas/novas/Bula_Cilidon.pdf

Foram calculadas quantas moléculas de PHMB estavam contidas em cada 10 μ L das diluições que foram usadas nos experimentos. Os resultados deste procedimento estão mostrados no quadro 2.

4.5.2- Teste da eficiência germicida com PHMB

Para testar a eficiência germicida das moléculas de PHMB, 1mL da suspensão bacteriana ativada foi transferido, com auxílio de uma pipeta graduada em centésimos, para uma placa com ATEL. Após a adição da suspensão bacteriana na superfície da placa esta foi movimentada, suavemente, para que toda a superfície fosse, homogeneamente, contemplada pela cobertura bacteriana. Em seguida o volume excedente foi removido e anotado, quanto do conteúdo da suspensão bacteriana ficou retido na superfície gelificada da placa. Esse procedimento foi a estratégia utilizada para calcular a quantidade de UFC que ficava retida e distribuída, de forma homogênea, pela área da superfície do meio gelificado com Agar-Agar. Com esse procedimento foi calculado quantas células bacterianas ocupavam cada centímetro quadrado da superfície do gel. As placas usadas neste tipo de teste eram mantidas, semi-aberta, na cabine do fluxo laminar até que o biofilme bacteriano estivesse, visivelmente, seco. Sobre esse tapete bacteriano foram aplicados, em duplicata, 10 μ L de cada uma das preparações diluídas de PHMB (2^{-1} a 2^{-8}), em posições equidistantes, previamente, marcadas no fundo da placa (Gilbert e Moore 2005; Barrett *et al.*, 2010)

Depois que o volume de líquido da gota secava, a placa era incubada em estufa a 37°C por 18h.

4.5.3- Fórmula para calcular a área em cm^2

Para análise e interpretação dos resultados foi efetuada a medição dos halos de inibição de crescimento resultantes da ação germicida gerada pelas diferentes diluições de PHMB, com especial atenção à maior diluição do germicida que provoca a morte do total de bactérias que estavam presentes na área correspondente ao respectivo halo de inibição.

Para calcular a área do halo de inibição do crescimento bacteriano, gerado na maior diluição de PHMB, o diâmetro desse halo foi medido com auxílio de um paquímetro. A medição obtida era aplicada na seguinte fórmula:

$$S = \pi R^2 \text{ (Fórmula 1)}$$

Sendo: S = Superfície do halo em cm^2 ; π = constante, considerada como tendo o valor 3,1416; R^2 = medida do raio em cm, elevada ao quadrado.

Com o intuito de definir a quantidade de bactérias que ocupavam a área do halo sem crescimento foram efetuados os cálculos para atender aos seguintes objetivos:

- 1- Determinar a quantidade de UFC que esteja presente na suspensão bacteriana original que foi usada para formar o tapete microbiano no teste do germicida;
- 2- Registrar o volume da suspensão bacteriana original que ficou retido na superfície da placa teste;
- 3- Definir a área total da superfície interna, em cm^2 , da placa usada no teste, de acordo com a Fórmula 1;
- 4- Encontrar o número de UFC que está distribuído em cada cm^2 da superfície do meio de cultivo. Para isso, a quantidade total de bactérias que ficou retida na placa foi dividida pela área total da superfície interna da placa;
- 5- Estabelecer a quantidade de UFC que estavam presente na área do halo, antes da aplicação do PHMB. Para isso a quantidade de bactérias, por cm^2 , definida no item 4 foi multiplicada pela área do halo de inibição encontrada pela fórmula 1. A quantidade de bactérias encontradas será considerada como sendo o total de bactérias mortas pela ação das moléculas de PHMB que estavam presentes nos 10 μL da diluição usada para o teste.
- 6- Calcular a área ocupada por uma única célula de *S.aureus*. Para isto foi considerado a medição do diâmetro médio das imagens de células mostradas na figura 1; com o diâmetro encontrado foi aplicada a fórmula mostrada no item 4.5.3.

7- Estabelecer a quantidade de **Áreas Equivalentes** à área de uma célula de *Staphylococcus* que podem estar contidas na área do halo. A justificativa de usar esse parâmetro deve-se ao fato das moléculas de Polihexametileno Biguanida, diferente das da Ampicilina, não se difundirem na camada do meio de cultura. Assim sendo, o conteúdo da gota contendo PHMB forma um manto que cobre toda a área do halo. Sabendo-se quantas moléculas de PHMB ocupam uma "Área Equivalente de *Staphylococcus*" essa quantidade pode ser considerada como o provável montante de moléculas que é necessário para matar cada uma das células de *S.aureus*.

8- Considerar a possibilidade de estabelecer uma correlação direta entre o número de moléculas de PHMB no halo com a quantidade de células microbianas que estava distribuída na zona do halo provocado pela menor concentração efetiva de PHMB;

9- Demonstrar a relação entre a quantidade de "Áreas Equivalentes de *Staphylococcus*" com o número de UFC que estavam presentes na área do halo. Essa correlação tem a finalidade de caracterizar os espaços vazios existentes na zona do halo, ou seja, aqueles onde não existe uma célula de *S.aureus* adsorvida à superfície do meio de cultura.

10- Justificar porque a base dos cálculos das áreas usadas para definir a quantidade de moléculas de PHMB que é necessária para matar uma bactéria deve ser ainda, um valor provável, em razão das múltiplas variáveis numéricas envolvidas:

- Sabidamente, há limitação em definir o diâmetro do halo, pois este era aferido com paquímetro que fornece medidas na ordem de décimo de milímetro, enquanto a acuidade visual humana está limitada em 0,2 milímetros e o tamanho dos corpos bacterianos, que estão distribuídos pela superfície do gel de Agar, está na faixa de milésimo de milímetro. Para sanar parte dessa limitação, as imagens das placas eram ampliadas, na tela de um computador, até alcançar um aumento de 4 a 20 x, ou seja, quando a placa aparecer com o diâmetro equivalente a 36 cm a 180 cm. A medição feita nas imagens ampliadas fornece uma melhor definição na acuidade dos resultados. Haja vista que, com uma ampliação de 20 x, cada 0,2 mm aparecerá como sendo 4 mm e, conseqüentemente, 0,05 mm como um milímetro, ou seja, uma dimensão visível.

4.5.4 Testes de exposição dos *S. aureus* (BMB 9393) aos efeitos das moléculas de Polihexametileno Biguanida, por 30 minutos

Neste ensaio foram usadas quatro suspensões bacterianas contendo, respectivamente, 50.000, 25.000, 12.500 e 6.250 UFC em 50 µL. A cada uma destas preparações Na execução deste experimento foi adotada uma estratégia para garantir o cronograma dos ensaios. De cada

amostra da mistura PHMB-bactéria foi mantida por 30 minutos a 37° C e em seguida 10µL de cada mistura era depositada, em duplicata, sobre a placa de ATEL, para avaliar a quantidade de UFC sobrevivente. Após verificar que a gota deposita estava seca, a placa era incubada em estufa à 37 ° C, por 18h.

Nos ensaios subsequentes, foram testadas a influência de agentes neutralizantes da ação das moléculas de PHMB, e a interferência exercida pelos debris celulares sobre a eficiência germicida das moléculas de PHMB, nos testes quantitativos. Para o primeiro caso, foi usada a solução neutralizante universal contendo em sua composição Tween 80-0,3%, Lecitina-0,3%, histidina-0,1% e tiosulfato de sódio 0,5%, recomendada por (Romão, 1985). Para o segundo caso, uma cultura recente de *S.aureus*, em meio sólido, foi ressuspensa em solução salina, para atingir a turvação de 0,5 da escala de McFarland. Essa suspensão foi dividida em alíquotas de dois mL que foram submetidas ao processo de lavagem por centrifugação com os seguintes diluentes: água destilada para injeção; salina, PBS e PBS+Citrato e depois, todas elas reajustadas para os dois mL originais. As lavagens consistiram de três ciclos de centrifugação a 3000 rpm por 3 minutos.

4.6 - Testes com antibiótico

4.6.1 - Cálculos teóricos para definição das concentrações de Ampicilina utilizadas nos testes para avaliação da Relação antibiótico- bactéria

As soluções de Ampicilina foram preparadas com solução salina esterilizada a partir da preparação comercial em frasco-ampola contendo 500mg de Ampicilina sódica. Depois de aberto, asépticamente, foi preparada a solução mãe de Ampicilina contendo 100 mg/mL e estas foram mantidas congelada a -20° C.

Foram calculadas quantas moléculas de Ampicilina estavam contidas em cada 10µl das diluições que foram usadas nos experimentos. O resultado deste procedimento está mostrado no quadro 2.

4.6.2 - Ensaio quantitativo da relação entre número de moléculas de antibióticos disponíveis para cada bactéria em um halo de inibição.

As culturas bacterianas resistente (*S aureus* - BMB-9393) e sensível (*S aureus* -30), em fase log de crescimento, foram previamente quantificadas em UFC/10 µL e a seguir diluída na proporção

de 1:100 (10^{-2}), para serem utilizadas num teste com antibiótico. O procedimento do inóculo para esse tipo de ensaio foi baseado no uso de uma cultura em fase logarítmica de crescimento para ser quantificada em UFCs e depois usada para formação do tapete celular na superfície do meio gelificado.

Sobre a camada do biofilme bacteriano, visivelmente, secos foram aplicados, na placa, em duplicata, 10 μ L da preparação da Ampicilina nas diluições 10^{-1} até 10^{-5} . Essa escolha das diluições foi definida por experimentos preliminares sobre o diâmetro do halo de inibição promovido por cada concentração de Ampicilina na amostra microbiana sensível. Após adsorção do volume adicionado, a placa foi mantida em estufa a 37° C, por 18h, para avaliação e interpretação dos resultados, incluindo, neste caso, a confirmação da resistência na amostra de MRSA e a dimensão do halo de inibição do crescimento. Conhecendo-se esses dois últimos parâmetros e a concentração molar da ampicilina que provoca halo de inibição total do crescimento bacteriano, serão realizados cálculos para definir quantas bactérias foram mortas nos halos correspondentes e, por conseguinte, quantas moléculas do antibiótico estavam disponíveis para cada célula bacteriana.

Para obtenção desses resultados foram feitos um total de quatro repetições para cada substância.

5- Resultados

Conforme foi organizada a sequência de apresentação do tópico Materiais e Métodos, os resultados estão mostrados de forma equivalente.

5.1 - Preparo e quantificação das amostras bacterianas

Em referência aos itens 4.1, 4.2 e 4.3, os resultados estão mostrados na figura 8, mostra o esquema de diluição para contagem de UFC, a partir da cultura bacteriana, previamente ativada para alcançar a fase log. de crescimento.

Contagem de UFC em 10 μL por diluição seriada na base10 (10^{-1} a 10^{-8})

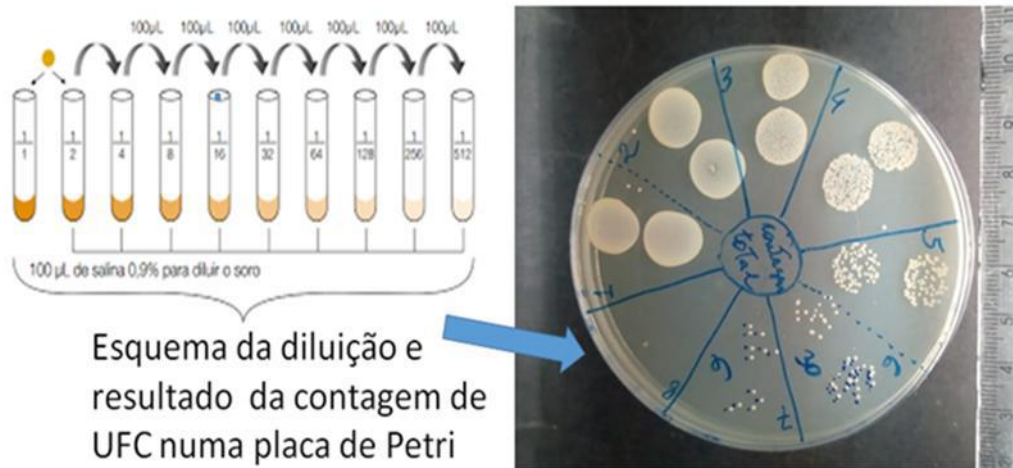


Figura 8 - representação artística do processo de diluição adotado nos experimentos e apresentação de um resultado de contagem de UFC baseado no método de diluição para quantificação múltipla.

Na observação da placa de Petri da foto acima podem ser contadas 6 e 7 colônias na área que recebeu 10 μL da cultura bacteriana da diluição 10^{-7} . Portanto, se na diluição 10^{-7} foram contadas, na média, 6,5 UFCs, então a suspensão original continha: $6,5 \times 10^7$ UFCs por 10 μL e, conseqüentemente, $6,5 \times 10^9$ UFCs por mL.

5.2- Resultados dos estudos com PHMB.

5.2.1- Procedimentos teóricos com PHMB

Os resultados dos ensaios teóricos referentes aos cálculos para definir a quantidade de moléculas de PHMB presentes em 10µL de uma solução diluída a partir da concentração 0,2% estão mostrados no quadro 2. Nesse quadro o destaque está para os valores apresentados na última linha, pois correspondem à quantidade moléculas de PHMB contidas em cada 10µL das diluições utilizadas nas diversas etapas deste trabalho.

Quadro 2 cálculo do número de moléculas de PHMB, em 10 µL das soluções diluídas a partir da concentração 0,2%.

Cálculo do número de moléculas de PHMB, por 10 µL, nas diluições a partir da concentração a 0,2%					
	1:2	1:4	1:8	1:16	Diluição
	0,1	0,05	0,025	0,0125	g%
	1	0,5	0,25	0,125	g/L
	0,00037037	0,000185185	9,25926E-05	4,62963E-05	Mol/L
	3,7037E-09	1,85185E-09	9,25926E-10	4,62963E-10	Mol/10µL
	222,96296296296300	111,48148148148100	55,74074074074070	27,87037037037040	n moléculas*E14
	22296296,296296300	11148148,148148100	5574074,074074070	2787037,037037040	n moléculas*E9
	222962962,96296300	111481481,48148100	55740740,74074070	27870370,37037040	n moléculas*E8
Cálculo do número de moléculas de PHMB, por 10 µL, nas diluições a partir da concentração a 0,2%					
	1:32	1:64	1:128	1:256	Diluição
	0,00625	0,003125	0,0015625	0,00078125	g%
	0,0625	0,03125	0,015625	0,0078125	g/L
	2,31481E-05	1,15741E-05	5,78704E-06	2,89352E-06	Mol/L
	2,31481E-10	1,15741E-10	5,78704E-11	2,89352E-11	Mol/10µL
	13,93518518520	6,96759259259259	3,48379629629630	1,7418981481	n moléculas*E14
	1393518,518518520	696759,259259259	348379,629629630	174189,8148148150	n moléculas*E9
	13935185,18518520	6967592,59259259	3483796,29629630	1741898,1481481500	n moléculas*E8

5.2.2-Resultados do teste da ação germicida com amostras não lavadas

Como resultado dos experimentos descritos no item 4.5.1, os resultados mostrados na figura 9 apresentam o aspecto de uma cultura de *S. aureus* (amostra30), não lavada, tratada com as diferentes concentrações de PHMB. Neste ensaio, foram usadas diluições no intervalo entre 1:16 e 1:32, frente a um tapete celular contendo 5.013.367 UFC/cm². A diluição 1:32 mostra uma inibição parcial, portanto não permite definir quantas UFC foram mortas na zona de inibição. A diluição 1:28 o resultado sugere que 2.647.559 UFC foram mortas.

Concentração inicial da preparação de PHMB era 0,2%

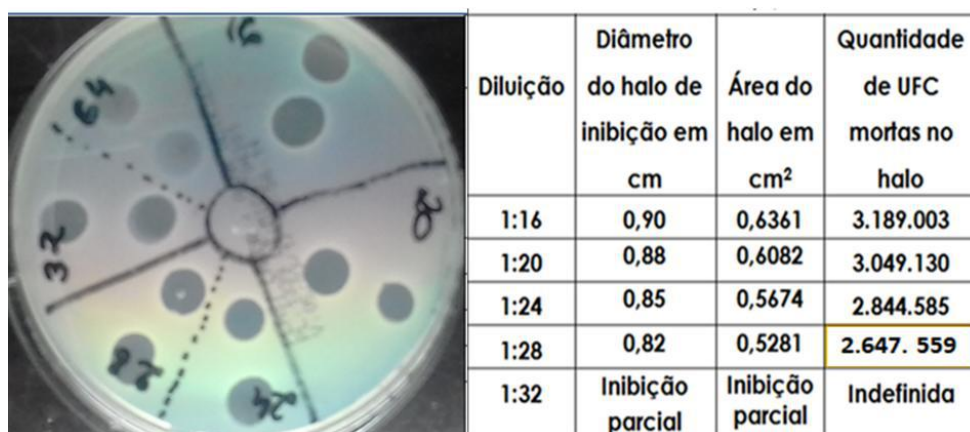


Figura 9- Resultado para definição preliminar de efeito das moléculas de PHMB contidas em 10µL da solução, sobre *S. aureus* (amostra 30), com atenção especial à diluição do germicida que promove a morte de todas as UFC existentes no halo de inibição do crescimento.

No quadro 3 estão detalhados os resultados do cálculo teórico para definir quantas moléculas de PHMB ocupam uma área equivalente à média de uma superfície ocupada por uma única célula de *S.aureus*. Com esses procedimentos ficou demonstrado que 12.279.941 moléculas de PHMB foram disponibilizadas nas áreas ocupadas por cada uma das bactérias contidas no halo de inibição.

Neste ensaio, a ocupação populacional da área do halo de inibição mantinha uma relação de uma célula de *S.aureus* para cada 4,6 de Área Equivalente. No quadro 3 complemento da figura 9 mostra a quantidade de moléculas de PHMB que ocupam uma área equivalente a uma célula de *S. aureus* e a relação entre o número de Áreas equivalentes e o número de UFC que ocupava a área do halo.

Quadro 3 complemento da figura 9, mostra a quantidade de moléculas de PHMB que ocupam uma área equivalente a uma célula de *S. aureus* e a relação entre o número de Áreas equivalentes e o número de UFCs que ocupava a área do halo.

Diluição	Diâmetro do halo de inibição em cm	Área do halo em cm ²	Área do halo em μm^2	Quantidade de Áreas Equivalente à área de um <i>S. aureus</i> (0,4072 μm^2)	Quantidade de UFC monas no halo	Quantidade de Moléculas de PHMB por Halo	Moléculas de PHMB por Área Equivalente de <i>S. aureus</i>	Relação Área Equivalente de <i>S. aureus</i> por UFC mona
1.16	0,90	0,6361	63.610.000	156.213.163	3.169.003	27670370,37037040	17.641.243	5,6
1.20	0,88	0,6082	60.630.000	149.361.493	3.049.130	22296296,29629630	14.927.741	4,9
1.24	0,85	0,5674	56.740.000	139.341.647	2.844.585	18560246,91356030	13.334.291	4,7
1.28	0,82	0,5261	52.610.000	129.690.570	2.647.559	15925925,92592590	12.279.941	4,6
1.32	Inibição parcial	Inibição parcial			Indefinida			

Os resultados apresentados no quadro 4 mostram que, a população bacteriana, não lavada, que cobria a camada do meio de cultura na placa de Petri continha 2.840.355 UFC/cm², onde cada Área Equivalente à Superfície de um *S.aureus* continha 5.936.884 moléculas de PHMB e o espaçamento populacional era de uma bactéria em cada 53 AES. Essa suspensão continha (300.000.000 UFCs/mL). Sendo distribuído 0,5mL, (equivalente a 150.000.000 UFCs), na superfície da placa de Petri com área de 52,8103 cm⁻², ou seja, cada cm⁻² recebem 2.840.355 UFCs.

Quadro 4 PHMB em diferentes concentrações, frente a uma população de *S. aureus* não lavadas.

Diluição da PHMB	Concentração Molar	Diâmetro do halo de inibição - cm	Área do halo em cm ²	Quantidade de bactérias mortas	Relação PHMB/Bactéria no halo	Quantidade de Áreas Equivalentes à área ocupada por uma célula de <i>S.aureus</i> no halo	Relação PHMB Área Eq Staphylo	Relação Área Eq Staphylo/bactéria
1:2	0,1	1,30	1.3273	3.770.003				
1:4	0,05	1,30	1.3273	3.770.003				
1:8	0,025	1,30	1.3273	3.770.003				
1:16	0,00125	1,20	1.1309	3.212.157				
1:32	0,000625	1,10	0.9503	2.699.285				
1:64	0,0003125	1,00	0,7854	2.230.784	312.338.290	117.361.111	5.936.884	53
1:128	0,00015625	Sem halo						
1:256	0,000078125	Sem halo						

5.2.3 - Teste da ação germicida em células Lavadas

Os resultados destes testes são referentes ao item 4.5.3 e estão mostrados nas figuras 10 A e B. Nestes ensaios a suspensão bacteriana foi lavada com diferentes diluentes e resuspensão em solução salina. A suspensão controle foi usada apenas após ser diluída em solução salina.

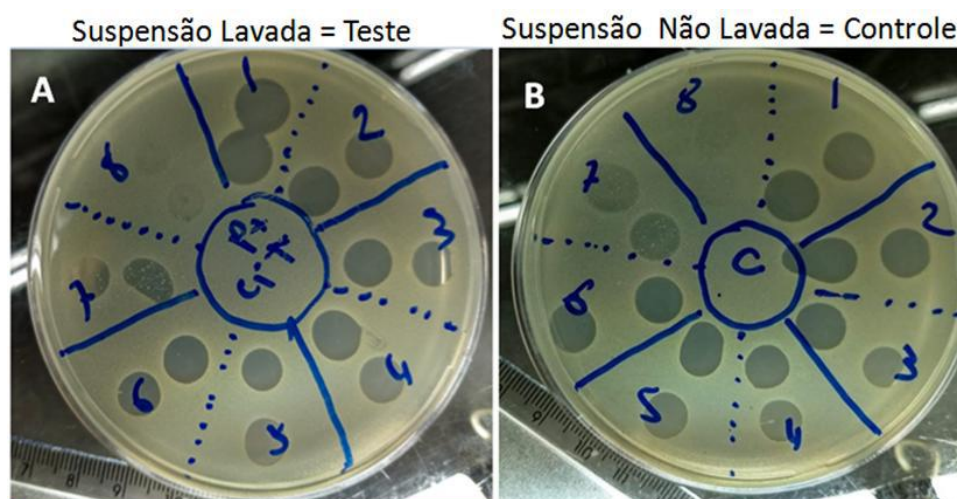


Figura 10 A e B - imagem ilustrativa do resultado de um ensaio para definição da relação entre a quantidade de moléculas de PHMB que interagem com uma única célula de *S. aureus* BMB 9393

Como os Quadros 5a, 5b e 5c abrangem um grande conteúdo de referenciais, por isso está representado três unidades. Esses quadros apresentam os efeitos das moléculas de PHMB em preparações bacterianas que foram, previamente, lavadas para remoção dos resíduos celulares ou resquícios do meio de cultura, notadamente, componentes que interferem na ação catiônica das

moléculas de PHMB. Nos quadros, os destaques estão apresentados em negrito. O destaque especial cabe à amostra de *S.aureus* (BMB 9393) lavada com salina, onde foi encontrado que cada uma das células podia ser morta com uma quantidade de $3,6 \times 10^6$ moléculas de PHMB, numa área onde o espaçamento populacional era de uma bactéria para cada 53 AES.

Quadro 5a- Conjunto de resultados dos experimentos práticos e teóricos utilizados para determinar o provável número de moléculas de PHMB que é necessário para matar uma única célula de *S. aureus* (BMB9393) em preparações não lavadas e lavadas para remoção dos resíduos celulares. Para efeito de cálculo, foi considerado $0,72 \mu\text{m}$ como diâmetro médio de uma célula de *S. aureus* correspondendo a uma área de $0,4072 \mu\text{m}^2$

Solução usada para lavar as células	Suspensão das células	Volume de suspensão bacteriana retido em cada ensaio	Bactérias por cm^2 , na superfície da placa	Máxima diluição efetiva da PHMB	Diâmetro do halo de inibição formado	Área do Halo de inibição em cm^2	Quantidade de bactérias por halo de inibição
Salina	Salina	0,30	852.107	1: 64	1,00	0,7854	669.245
Citrato+PBS	Salina	0,30	852.107	1: 64	0,92	0,6677	568.952
Água destilada	Salina	0,30	852.107	1: 64	0,79	0,4901	417.618
PBS	Salina	0,43	1.221.353	1: 64	0,81	0,5153	629.363
Sem lavar	Salina	0,30	852.107	1: 64	0,90	0,6362	542.110

Quadro 5b - Conjunto de resultados dos experimentos práticos e teóricos utilizados para determinar o provável número de moléculas de PHMB que é necessário para matar uma única célula de *S. aureus* (BMB 9393), em preparações lavadas e não lavadas.

Solução usada para lavar as células	Bactérias por halo de inibição	Área do halo de inibição em cm ²	Área do halo em μm^2 , provocado pela maior diluição efetiva do PHMB.	Quantidade moléculas de PHMB X 10 ⁸ presente em cada μm^2 da área de inibição, em função da solução do número de Avogadro (6,02X10 ²³)	Quantidade de moléculas de PHMB por bactérias, na área do halo de inibição.	Quantidade de Áreas Equivalentes à Superfície do <i>S. aureus</i> , na zona do halo de inibição.
Salina	669.245	0, 7854	78540000	6.967.592,59259259	1.041.112.639	192.901.235
Citrato+PBS	568.952	0, 6677	66770000	6.967.592,59259259	1.224.636.613	163.993.066
Água destilada	417.618	0, 4901	49010000	6.967.592,59259259	1.668.414.337	120.372.925
PBS	629.363	0, 5153	51530000	6.967.592,59259259	1.107.086.112	126.562.269
Sem lavar	542.110	0, 6362	63620000	6.967.592,59259259	1.285.271.718	156.256.386

Quadro 5a- Conjunto de resultados dos experimentos práticos e teóricos utilizados para determinar o provável número de moléculas de PHMB que é necessário para matar uma única célula de *S. aureus* (BMB9393) em preparações não lavadas e lavadas para remoção dos resíduos celulares. Para efeito de cálculo, foi considerado 0,72 µm como diâmetro médio de uma célula de *S. aureus* correspondendo a uma área de 0,4072 µm²

Solução usada para lavar as células	Suspensão das células	Volume de suspensão bacteriana retido em cada ensaio	Bactérias por cm ² , na superfície da placa	Máxima diluição efetiva da PHMB	Diâmetro do halo de inibição formado	Área do Halo de inibição em cm ²	Quantidade de bactérias por halo de inibição
Salina	Salina	0,30	852.107	1: 64	1,00	0,7854	669.245
Citrato+PBS	Salina	0,30	852.107	1: 64	0,92	0,6677	568.952
Água destilada	Salina	0,30	852.107	1: 64	0,79	0,4901	417.618
PBS	Salina	0,43	1.221.353	1: 64	0,81	0,5153	629.363
Sem lavar	Salina	0,30	852.107	1: 64	0,90	0,6362	542.110

5.2.4- Teste Germicida em 30 minutos

Os resultados deste teste são referentes ao item 4.5.3 estão apresentados no quadro 6. Neste teste, diferentes concentrações de bactérias foram suspensas em solução salina e depois misturadas com diferentes concentrações de PHMB, durante 30 minutos. Os resultados mostram que existe uma relação direta entre quantidade de bactérias e quantidade do germicida, quando as preparações

foram testadas com diluições equivalentes, na base 2. Os destaques estão apresentados em cores nas células da tabela, que demonstra que há uma influência conjunta, envolvendo tanto o germe quanto do agente germicida, e nos números realçados que mostram a influência das concentrações do germicida sobre uma mesma população bacteriana (**quadro 6**)

Quadro 6 - Resultado da interação PHMB - *S. aureus*, durante 30 minutos, (50 µL de suspensão bacteriana em diferentes concentrações de PHMB misturada com 50µL das concentrações de PHMB).

Diluição efetuada	Concentração Molar	Quantidade de UFC de <i>S.aureus</i> /10 µl utilizada no teste			
		50.000	25.000	12.500	6.250
1:2	0,1	A	A	A	A
1:4	0,05	A	A	A	A
1:8	0,025	A	A	A	A
1:16	0,00125	A	A	A	A
1:32	0,000625	34	1	A	A
1:64	0,0003125	?	17	A	A
1:128	0,00015625	?	88	8	A
1:256	0,000078125	?	?	?	14

? = número incontável de colônias; A= Ausência de colônias

5.3. -Teste com antibiótico - Ampicilina.

5.3.1 - Procedimentos teóricos com a Ampicilina

Os resultados referentes aos experimentos descritos no item 4.6.1 estão apresentados na quadro 7. Por meio de procedimentos teóricos foi possível estabelecer a quantidade de moléculas de Ampicilina contida em cada 10 µL das diferentes concentrações do antibiótico. A preparação

original consistiu de uma solução contendo 100 mg/mL, concentração esta que foi transformada em Molaridade para depois serem definidas quantas foram usadas nos teste frente a uma amostra de *S.aureus* (amostra 30), que para ser usada nos testes eram previamente preparada e quantificada por UFC, conforme descrito nos item 4.1 e 4.2.

Quadro 7 cálculo para definição do número de moléculas de antibiótico usado em cada ensaio.

Peso molecular (PM) da Ampicilina= 349, 406

Quadro 7 - Cálculo do número de moléculas de Ampicilina, por 10 µL nas diluições a partir da concentração 100 mg/mL

Cálculo do número de moléculas de Ampicilina, por 10 µL, nas diluições usadas, obtidas a partir da solução original contendo 100 mg / mL				
10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻³	Diluição
10	1	0,1	0,01	mg/mL
10	1	0,1	0,01	g/L
0,028620001	0,002862	0,0002862	2,862E-05	Mol/L
2,862E-07	2,862E-08	2,862E-09	2,862E-10	Mol/10µL
1722,924048	172,2924048	17,22924048	1,722924048	n moléculas*E14
172292404,8	17229240,48	1722924,048	172292,4048	n moléculas*E9
1722924048,24187000	172292404,82418700	17229240,48241870	1722924,04824187	n moléculas*E8

5.3.2 - Procedimentos Experimentais com a Ampicilina:

No quadro 7 está ilustrado o resultado do teste de quantificação para definir a quantidade de moléculas de Ampicilina que gerou a morte do total de bactérias, previamente, contidas nos halos de inibição observados. Em função da dimensão da régua na figura foi calculado o diâmetro dos halos de inibição. Depois foram feitos os cálculos de acordo com os procedimentos de avaliação do efeito germicida descritos no item 4.5.2.

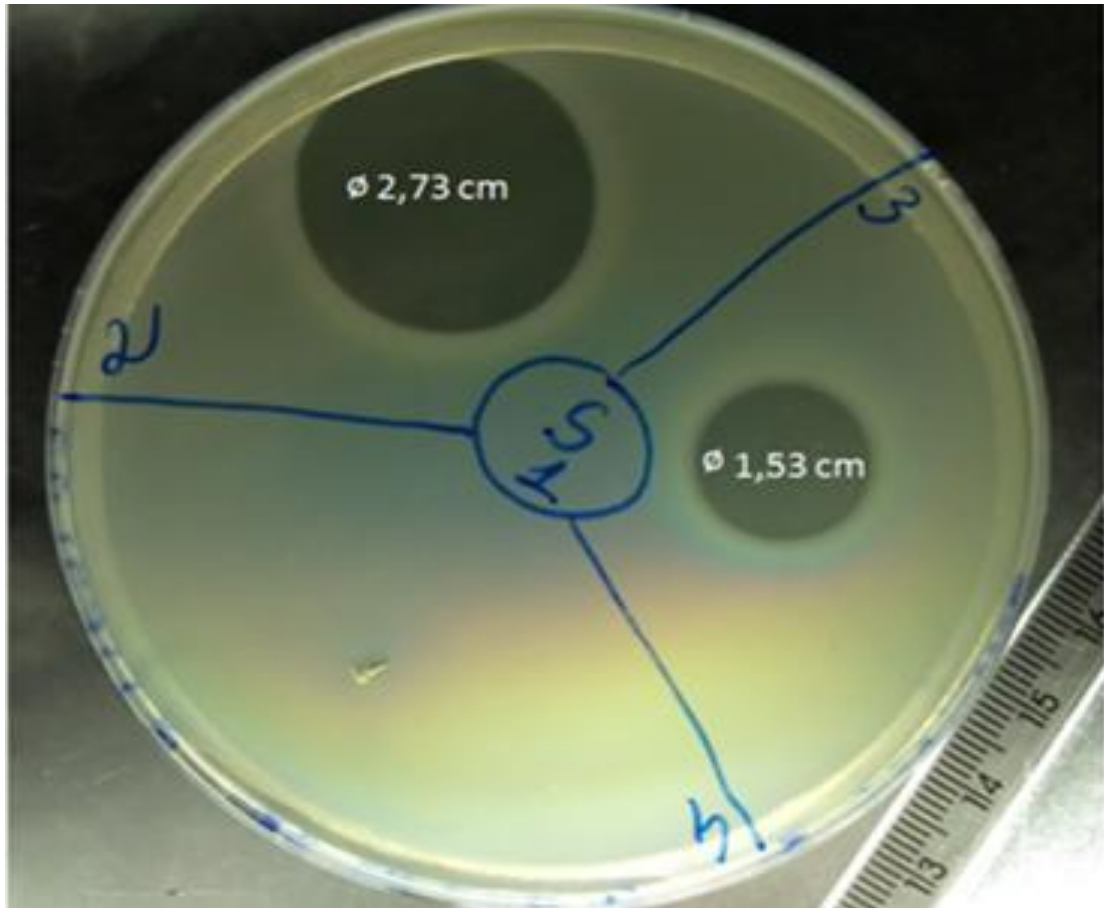


Figura 11: Resultado do teste de antibiose onde a preparação de *S. aureus*, amostra 30, frente as concentrações de ampicilina, nas concentrações de 10 e 1 μ g/ 10 μ L. Cada cm² da superfície da placa continha 3.067.583 UFC

Com base nos resultados apresentados na figura 11 foi possível definir a quantidade de moléculas de Ampicilina que foram disponibilizadas para geração das duas zonas de antibiose. Nestes resultados encontram-se como destaque o halo de inibição gerado por uma proporção de 365.489.334 moléculas de Ampicilina disponibilizadas para cada célula de *S.aureus*, contida na área do halo. Enquanto, com a segunda amostra de *S.aureus* (amostra 30) estavam disponibilizadas 1.788515499 moléculas de Ampicilina para cada UFC.

Quadro 8 - Resultado dos experimentais e teóricos para determinação do número provável de moléculas de Ampicilina disponível para cada célula de *S. aureus* no modelo experimental usado neste trabalho. Peso molecular (PM) da Ampicilina=349,406

S aureus Amostra 30 (Sensível à Ampicilina)	Teste com e antibiótico diluído na base 10 a partir da concentração de 100mg/ml	Concentração de antibiótico usado nos testes em g litro	Quantidades de moléculas de Ampicilina contidas em 10 µl das respectivas diluições do antibiótico	Quantidade de bactérias contidas inicialmente na área do halo de inibição	Quantidade de moléculas de antibióticos disponível para cada célula de S aureus nos diferentes testes	Quantidade média de moléculas de Ampicilina disponível para cada célula de S. aureus. nos diferentes testes
S1	-2	1.0	172292404 82418700 E*8	17 956 121	959 519 090	
	-3	0.1	17229240 48241870 E*8	5 639 883	305 489 334	
S2	-2	1.0	172292404 82418700 E*8	9 633 263	1 788 515 499	
	-3	0.1	17229240 48241870 E*8	3 504 770	491 594 045	
Somatório					3 545 117 969	886.279.492

6-DISCUSSÃO

Conforme foi organizada a sequência de apresentação do tópico resultados, os itens da discussão estão mostrados de forma equivalente.

6.1 - Sobre o preparo e quantificação das amostras bacterianas

Em relação aos os resultados que estão mostrados na figura 8, os autores (Pignatari *et al.* 1990) ressaltam a importância desse procedimento como etapa crítica para a avaliação experimental de agentes germicidas. Essa recomendação também corroborada por (Luna *et al.* 2010), e assim justificamos o embasamento de nossos experimentos. Cabe ressaltar que o método adotado neste trabalho, gera ganho temporal e econômico nos procedimentos, se comparados aos dos citados autores, sem comprometer a acuidade da quantificação bacteriana, cabe ainda salientar que a principal exigência no método é assegurar que a cultura bacteriana, esteja previamente ativada, ou seja, em fase logarítmica de crescimento.

6.2- Moléculas de PHMB presentes em 10 μ L

Os cálculos efetuados, a partir da definição da Molaridade das soluções de PHMB usadas nos teste, serviram para determinar a relação entre o número de moléculas de PHMB por UEA da superfície dos *S.aureus*. Com esse parâmetro o objetivo do trabalho foi alcançado com êxito.

6.2.1 - Procedimentos teóricos com PHMB

A finalidade deste tópico foi facilitar a execução dos cálculos que definiram a quantidade de moléculas de PHMB presentes em 10 μ L de uma solução diluída, a partir da concentração 0,2% mostrada no **quadro 2**. O uso desses dados é fruto do trabalho disponibilizado pela Comissão Européia para segurança da saúde e dos alimentos, em 2017, que apresentou o peso molecular das PHMB, variando entre 2.300 e 3.100, peso este que foi adotado neste trabalho (SCCS, 2017). Com base no cálculo de molaridade e no Número de Avogadro, foi possível estabelecer a quantidade moléculas de PHMB contidas em cada 10 μ L das diluições utilizadas nas diversas etapas deste trabalho. Entretanto reconhecemos que há limitação na definição do peso molecular das moléculas de PHMB, Para compensar essa margem de erro, nos cálculos do número de moléculas foi utilizado como peso molecular a média entre os dois valores, ou seja, 2.700.

6.2.2- Ensaio de PHMB com amostras bacterianas não lavadas figura 9 quadro 3

A utilização dos resultados dos experimentos mostrados na figura 10 com a cultura de *S. aureus* (amostra30), para definir quantitativamente a interação PHMB-bactéria pôde ser considerada pelo fato de, haver o prévio conhecimento do volume de suspensão bacteriana que ficava retido na placa teste. Dessa maneira eram calculadas quantas bactérias ocupavam cada cm^2 da superfície do meio de cultura, e, por conseguinte, quantas bactérias ocupavam a área da zona de inibição do crescimento gerado por cada diluição de PHMB testada. Para efeito de cálculo de eficiência foi considerada a maior diluição de PHMB que provocava a morte de todas as bactérias existentes no halo de inibição.

6.2.3-Ensaio de PHMB com amostras bacterianas lavadas.

Os resultados destes testes nas figuras 10 A e B estão representados nos quadros 5 a, b e c. Apresentam como principal diferença dos testes efetuados com as amostras não lavadas o fato do efeito do germicida das moléculas de PHMB aparecer até na diluição 1:64 entendendo esses resultados como decorrente da ausência de debris celulares ou resíduos do meio de cultura, elementos estes que, por suas cargas negativas, reduzem a eficácia das moléculas de PHMB. Ao adotar a unidade de **Áreas Equivalentes** à área de uma célula de *Staphylococcus* foi possível justificar um novo parâmetro para definir a quantidade efetiva de moléculas de PHMB, necessária para matar cada uma das células de *S.aureus*. Nesse caso, podemos propor que, com a amostra de *S.aureus* lavada com salina, cada uma das células podia ser morta com uma quantidade de $3,6 \times 10^6$ moléculas de PHMB, independente do espaçamento populacional na área do halo. A suspensão bacteriana que foi submetida ao neutralizador do PHMB não apresentou alteração em relação aos testes sem neutralizador.

6.2.4- Teste da Interação PHMB - bactéria, por 30 minutos.

Os resultados apresentados no quadro 6 permitiram demonstrar que existe uma correlação direta entre o número de células e o número de moléculas usadas nos ensaios.

Pelo posicionamento das células, pode-se ser imaginar uma linha reta unindo os vértices destas células, sugerindo assim a existência de uma correlação direta entre a concentração de germes e a concentração do germicida. Esta proposição é também corroborada no ensaio envolvendo a

concentração de 25.000 UFC/10 μ L frente às quantidade de moléculas de PHMB contidas nas diluições 1:32, 1:64 e 1:128.

6.3 - Procedimentos com Ampicilina

6.3.1- Procedimentos teóricos com Ampicilina

Os resultados apresentados no quadro7 foram decorrentes de procedimentos teóricos visando definir a quantidade de moléculas de Ampicilina contida em cada 10 μ L das concentrações do antibiótico usadas nos testes em correlação coma molaridade da solução, o que permitiu utilizar o cálculo das moléculas pelo número de Avogadro.

6.3.2-Procedimentos experimentais com Ampicilina

Os resultados apresentados na figura 11 sugerem que é possível ser feita uma quantificação estimativa mostrando o quanto de moléculas de ampicilina estão envolvidas com o aparecimento do halo de inibição do crescimento de uma população susceptível. No caso das duas amostras de *S.aureus* 30 usadas neste estudo, está demonstrado que não houve aparecimento de colônias resistentes na zona do halo de inibição. O modelo de estudo adotado neste ensaio somente permite estimar a proporção de moléculas de ampicilina que foram disponibilizadas para cada célula de *S. aureus*, contida na área do halo. Há muitos fatores interferentes ainda a serem caracterizados haja vista que foi encontrado um valor de 365.489.334 moléculas de ampicilina num ensaio e 1.788.515.499em outro. Considerando que a solução do antibiótico chega à área das bactérias como uma enxurrada em todas as direções e as moléculas, são incorporadas ao meio de cultura, depois que a gota seca e, por difusão passiva, continuam a expansão centrífuga, diminuindo gradualmente a concentração no local da aplicação. Esse efeito difusivo diferencia do efeito das moléculas de PHMB que cobrem as células bacterianas, como um manto.

Considerando a quantidade de moléculas de ampicilina que foram disponibilizadas para gerar as duas zonas de inibição observadas na figura 11 e os números destacados no quadro 8, pode ser notado que a relação entre a quantidade de moléculas do antibiótico disponibilizadas para cada bactéria e da ordem de milhões (10^9) e que cada comprimido de 500 miligramas carrega 861×10^{18} moléculas de Ampicilina. Esses parâmetros são apenas o embasamento para uma grande jornada em busca da ampliação do conhecimento.

7- CONCLUSÕES:

Conforme proposto nos objetivos deste trabalho, o conjunto de procedimentos teóricos e experimentais aplicados na busca pelos resultados nos permite apresentar como conclusão que: o menor número de moléculas de Polihexametileno Biguanida necessária para matar uma única célula de *S. aureus* (BMB 9393) é estimado como sendo $3,61 \times 10^6$ e para provocar a morte de uma célula de *S. aureus* com a Ampicilina mostrou-se necessário, pelo menos, 3×10^8 moléculas, mas, com uma quantidade média estimada em 886.279.492. Esses resultados sugerem, portanto, a eficiência do antisséptico PHMB para indução de morte dos *Staphylococcus aureus* (BMB9393), sem o aparecimento de bactérias com resistência. Pelas repetições dos testes sem que houvesse a presença de UFC após a aplicação do germicida PHMB. A cepa de *S. aureus* (amostra 30), ainda se mostrou sensível à ampicilina.

8- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Azevedo, S. M. M. (2014) “Farmacologia Dos Antibióticos Beta-Lactâmicos.” Tese de doutorado. Universidade Fernando Pessoa e Faculdade de Ciência da Saúde 1: 57. http://bdigital.ufp.pt/bitstream/10284/4412/1/PPG_21378.pdf
- Almeida, G. D., Godoi, E. P., Santos, E. C., Paes de Lima, L. R., & Oliveira, M. E. D. (2014). Extrato aquoso de *Allium sativum* potencializa a ação dos antibióticos vancomicina, gentamicina e tetraciclina frente *Staphylococcus aureus*. *Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada*, 34(4), 487-492.
- Almeida, R. D. (2011). Vancomicina: Avaliação do uso em pacientes internados na Unidade de Terapia Intensiva.
- Barrett, S. *et al* (2010). Consensus document: PHMB and its potential contribution to wound management. Wounds UK, Aberdeen, 2010
- Cabral. M. C & Liberto, M. I M (2007) Dossiê PHMB (Poli-Hexa-Metileno-Biguanida). Documento publicitário efetuado em parceria com a Empresa Walkmed –Produtos Médicos.
- Cordeiro, R. P. (2004) Estudo de perfil de Sensibilidade / Resistência de cepas de *Staphylococcus aureus* MRSA do Hospital das Clínicas de Pernambuco. Dissertação apresentada ao Programa de Pós- graduação em Ciências Farmacêuticas, do Departamento de Ciências Farmacêuticas, da Universidade Federal de Pernambuco Recife – PE
- Cerqueira, E. S., & Almeida, R. C. D. C. (2013). *Staphylococcus aureus* resistente à metilicina (MRSA) em alimentos de origem animal: uma revisão sistemática. *Revista do Instituto Adolfo Lutz*, 72(4), 268-281
- Corredor, L. F., Moncayo, J. I., Santacruz, J. J., & Álvarez, A. (2012). Detección de genes de toxinas pirogênicas y toxinas exfoliativas em alimentos clínicos de *Staphylococcus aureus* em Colômbia. *Revista Investigaciones Andina*, 14(25), 577-587
- Demeu, F. A., da Rocha, C. M. B. M., da Costa, G. M., dos Santos, G., & Neto, A. F. (2015). Influência da escala de produção no impacto econômico da mastite em rebanhos bovinos leiteiros. *Revista Ceres*, 62(2), 167-174.
- Da Silva, E. C. B. F., Samico, T. M., Cardoso, R. R., Rabelo, M. A., Neto, A. M. B., de Melo, F. L.,... & Maciel, M. A. V. (2012). Colonização pelo *Staphylococcus aureus* em profissionais de enfermagem de um hospital escola de Pernambuco. *Revista da Escola de Enfermagem da USP*, 46(1), 132-137.
- Dias, N.L., Silva, D.C.B., Oliveira, D.C.B.S., Fonseca Junior, A.A., Sales, M.L., & Silva, N. (2011). Detecção dos genes de *Staphylococcus aureus*, enterotoxinas e de resistência à metilicina em leite. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, 63(6), 1547-1552. <https://dx.doi.org/10.1590/S0102-09352011000600036>
- De Moraes, J. J. PREVALENCIA E SENSIBILIDADE BACTERIANA DAS INFECÇÕES HOSPITALARES EM UM HOSPITAL FILANTRÓPICO NO PERÍODO DE 2006 A 2010.
- Enright, M., *et al*. (2002). The evolutionary history of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). In *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* (Vol. 99). <https://doi.org/10.1073/pnas.122108599>
- Fumarola S. (2011). Polyhexamethylene biguanide dressings in wound management, *Nurs. Stand.* 25 (46):63-68.
- Filho, S. A.; SILVA, C. G. N.; BIG, M. F. M. A. Bioprospecção e Biotecnologia. *Parcerias Estratégicas*. v. 19, n. 38, p. 45-80, 2014
- Figueiredo, A. F., Poli-de-Figueiredo, C. E., Meneghetti, F., Lise, G. A. P., Detofoli, C. C., & Silva, L. B. (2013). Peritonites em pacientes em diálise peritoneal: análise de um centro brasileiro segundo as recomendações da Sociedade Internacional de Diálise Peritoneal. *J BrasNefrol*, 35(3), 214-9.
- Gilbert, P., & Moore, L. E. (2005). Cationic antiseptics: Diversity of action under a common epithet. *Journal of Applied Microbiology*, 99(4), 703–715. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2005.02664.x>
- Gagetti, P., Wattam, A. R., Giacoboni, G., De Paulis, A., Bertona, E., Corso, A., & Rosato, A. E. (2019). Identification and molecular epidemiology of methicillin resistant *Staphylococcus pseud.* intermediou strain isola Ted fórum Ca nine clinical simples in Argentina. *BMC veterinary research*, 15(1), 264.

- Galvão, J. M. D. O. (2018). *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina colonizando pacientes em tratamento de hemodiálise (Master's thesis, Brasil).
- Gandra, E. Á., Gandra, T. K. V., de Mello, W. S., & da Silva Godoi, H. (2008). Técnicas moleculares aplicadas à microbiologia de alimentos. *Acta Scientiarum. Technology*, 30(1), 109-118.
- Guimarães, D. O, Momesso, L. D. S., & Pupo, M. T. (2010). Antibióticos: importância terapêutica e perspectivas para a descoberta e desenvolvimento de novos agentes. *Química Nova*, 33(3), 667-679.
- Hanson, B. M., Kates, A. E., O'Malley, S. M., Mills, E., Herwaldt, L. A., Torner, J. C.,... & Quick, M. K. (2018). *Staphylococcus aureus* in the nose and throat of Iowan families. *Epidemiology & Infection*, 146(14), 1777-1784.
- Hübner, N. O., Siebert, J., & Kramer, A. (2010). Octenidine dihydrochloride, a modern antiseptic for skin, mucous membranes and wounds. *Skin pharmacology and physiology*, 23(5), 244-258.
- Hodille, E., Rose, W., Diep, B. A., Goutelle, S., Lina, G., & Dumitrescu, O. (2017). The role of antibiotics in modulating virulence in *Staphylococcus aureus*. *Clinical microbiology reviews*, 30(4), 887-917.
- Junior, S., Ferreira, A. M., Rigotti, M. A., Santos, F. R. D., Furlan, M. C. R., & Andrade, D. D. (2018). AVALIAÇÃO DA EFICIÊNCIA DA LIMPEZA E DESINFECÇÃO DE SUPERFÍCIES EM UMA UNIDADE BÁSICA DE SAÚDE. *Texto & Contexto-Enfermagem*, 27(4).
- Jones, R. N. (2006). Microbiological features of vancomycin in the 21st century: minimum inhibitory concentration creep, bactericidal/static activity, and applied breakpoints to predict clinical outcomes or detect resistant strains. *Clinical infectious diseases*, 42(Supplement_1), S13-S24.
- Kaehn, K., & Eberlein, T. (2008). Polyhexanide (PHMB) and betaine in wound care management. *EWMA J*, 8(2), 13-17
- Kourtis, A. P., Hatfield, K., Baggs, J., Mu, Y., See, I., Epton, E., ... & Ray, S. M. (2019). Vital Signs: Epidemiology and Recent Trends in Methicillin-Resistant and in Methicillin-Susceptible *Staphylococcus aureus* Bloodstream Infections—United States. *Morbidity and Mortality Weekly Report*, 68(9), 214
- Liu, J., Chen, D., Peters, B. M., Li, L., Li, B., Xu, Z., & Shirliff, M. E. (2016). *Staphylococcal* chromosomal cassettes *mec* (SCC*mec*): a mobile genetic element in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Microbial pathogenesis*, 101, 56-67.
- Luna, C. M., Noriega, E. R., Bavestrello, L., & Gotuzzo, E. (2010). Tratamento de *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina na América Latina. *Braz. J. Infect. Dis*, 14, S121-S129.
- Minor, T. E., Marth, & E. H. (1972). Production of *Staphylococcal* enterotoxin A on cellophane-over-agar. *Applied microbiology*, 23(4), 833.
- Monteiro, M. C., Barros, L. L. D. S., & Maia, C. D. S. F. (2016). Fatores de risco associados ao agravamento de sepse em pacientes em Unidade de Terapia Intensiva. *Cadernos Saúde Coletiva*.
- Mashat, B. H. (2016). Polyhexamethylene Biguanide Hydrochloride: Features and Applications. *British Journal of Environmental Sciences*, 4(49), 49–55. Retrieved from <http://www.eajournals.org/wp-content/uploads/Polyhexamethylene-Biguanide-Hydrochloride-Features-and-Applications1.pdf>
- Moraes, P. L. Características da bactéria *Staphylococcus aureus*. *Brasil Escola*. Disponível em < http://brasilecola.uol.com.br/biologia/Staphylococcus_aureus.htm >. Acesso em, 17.
- Moriya, T., & Módena, J. L. P. (2008). Assepsia e antisepsia: Técnicas de esterilização. *Medicina*, 41(3), 261–269
- McDonnell, G.E (2007) Antisepsis, disinfection, and sterilization: Type, action, and resistance. *ASM Press. American Society for Microbiology*. Washington, Dc, Usa
- Müller, G., & Kramer, A. (2005). Effect of selected wound antiseptics on adult articular cartilage (bovine sesamoid bone) in the presence of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *Journal of orthopaedic research*, 23(1), 127-133.

- Menegotto, F. R., & Picoli, S. U. (2007). *Staphylococcus aureus* oxacilina resistente (MRSA): incidência de cepas adquiridas na comunidade (CA-MRSA) e importância da pesquisa e descolonização em hospital. *Rev Bras Anal Clin*, 39(2), 147-50.
- Nader F, A., Ferreira, L. M., Amaral, L. A., Rossi Junior, O. D., & Oliveira, R. P. (2007). Produção de enterotoxinas e da toxina da síndrome do choque tóxico por cepas de *Staphylococcus aureus* isoladas na mastite bovina. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, 1316-1318
- Oliveira, C. M. C., Sousa, M. G. S., Silva, N. D. S., Mendonça, C. L., Silveira, J. A. S., Oaigen, R. P., ... & Barbosa, J. D. (2011). Prevalence and etiology of bovine mastitis in the dairy region of Rondon do Pará, state of Pará. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 31(2), 104-110.
- Oliveira, A. C. D., & Paula, A. O. D. (2012). Descolonização de portadores de *Staphylococcus aureus*: indicações, vantagens e limitações. *Texto & Contexto-Enfermagem*, 21(2), 448-457.
- Pignatari, A., Pfaller, M., Hollis, R., Sesso, R., Leme, I., & Herwaldt, L. (1990). *Staphylococcus aureus* colonization and infection in patients on continuous ambulatory peritoneal dialysis. *Journal of clinical microbiology*, 28(9), 1898-1902.
- Peres, V., Moreira, R., Notário, J., & Zanusso Júnior, G. (2011). Isolamento e identificação de *Staphylococcus aureus* em fossas nasais e mãos de profissionais da saúde no Hospital Santa Lúcia em Maringá-PR. *REVISTA UNINGÁ*, 30(1). Recuperado de <http://revista.uninga.br/index.php/uninga/article/view/983>
- Romão, C. M. C. P. A. (1985). Avaliação da atividade antimicrobiana em três estágios de dois produtos comerciais utilizados em desinfecção hospitalar no Brasil (Doutoral dissertation, Instituto de Microbiologia da Universidade Federal do Rio de Janeiro.)
- Rosenthal, I., Juven, B. J., & Ben-Hur, E. H. U. D. (1982). Evaluation of poly (hexamethylene biguanide. HC1) as a biocide in the food industry. *Journal of food safety*, 4(4), 191-197
- Santos, A. L. *et al.* (2007). *Staphylococcus aureus*: visitando uma cepa de importância hospitalar *Staphylococcus aureus*: visiting a strain of clinical importance. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*, 43(6), 413-423. <https://doi.org/10.1021/ed067p473>
- Suarez, C. & Gudiol, F. (2009). Beta-lactam antibiotics. *Enfermedades Infecciosas Y Microbiologia Clinica*, 27, pp. 116-129
- Santos, P. D., & Fernandes, P. H. (2010). Utilização de Cloridrato de Polihexametileno Biguanida (PHMB) na desinfecção de indústrias cervejeiras. *Revista Eletrônica TECCEN*, 3(1), 59-67.
- Sutherland, R., & Rolinson, G. N. (1964). Activity of Ampicillin in Vitro Compared With Other Antibiotics. *Journal of Clinical Pathology*, 17, 461-465. <https://doi.org/10.1136/jcp.17.4.461>
- Santos, A. L. D., Santos, D. O., Freitas, C. C. D., Ferreira, B. L. A., Afonso, I. F., Rodrigues, C. R., & Castro, H. C. (2007). *Staphylococcus aureus*: visiting a strain of clinical importance. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*, 43(6), 413-423.
- Sales Júnior, J. A. L., David, C. M., Hatum, R., Souza, P. C. S., Japiassú, A., Pinheiro, C. T., ... & Dias, F. S. (2006). Sepsis Brasil: estudo epidemiológico da sepsis em unidades de terapia intensiva brasileiras. *Revista Brasileira de Terapia Intensiva*, 18(1), 9-17.
- Rossi, B. F. (2016). Caracterização molecular e fenotípica de *Staphylococcus aureus* na mastite bovina subclínica.
- Santos, E., & Silva, M. (2011). Treatment of colonized/infected wounds using polyhexanide. *Referência*, 3(4), 135-142.
- Silveira, G. P., Nome, F., Gesser, J. C., Sá, M. M., & Terenzi, H. (2006). Estratégias utilizadas no combate a resistência bacteriana. *Química Nova*, 29(4), 844-855
- SCCS, 2017 - The Scientific Committee on Consumer Safety () adopted this final opinion by written procedure on 07 April 2017. European Commission, Health and Food Safety. Directorate C: Public Health, Country Knowledge and Crisis Management, Unit C2 – Country Knowledge and Scientific Committees. Office: HTC 03/073, L-2920 Luxembourg, SANTE-C2-SCCS@ec.europa.eu

Tortora, G. J., Case, C. L., & Funke, B. R. (2016). Microbiologia-12ª Edição. Artmed Editora.

Thomas, G. W., Rael, L. T., Bar-Or, R., Shimonkevitz, R., Mains, C. W., Slone, D. S & Bar-Or, D. (2009). Mechanisms of delayed wound healing by commonly used antiseptics. *Journal of Trauma and Acute Care Surgery*, 66(1), 82-91.

Links:

<https://www.unifesp.br/campus/sao/noticias/1084-sepse-e-fatal-em-mais-de-55-dos-casos> Acesso em: 17 ago. 2019

http://www.anvisa.gov.br/servicosade/controlere/rede_rm/cursos/boas_praticas/modulo4/objetivos.htm (acessado em 12 de agosto,2019)

<https://www.cdc.gov/media/releases/2019/p0305-deadly-staph-infections.html> (Acesso em 20 de janeiro,2020)

https://www.google.com/search?q=staphylococcus+aureus&source=lnms&tbn=isch&sa=X&ved=0ahUKEwiJvfrVyYrjAhX_H7kGHYpsB_kQ_AUIECgB&biw=1280&bih=657#imgdii=wFtTMJmJxLHPUM:&imgrc=qqNslveVJqAWAM . (Acesso em 12 de agosto,2019)

<https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/8/82/Penicillin-core.png/200px-Penicillin-core.png>>.

<https://pt.wikipedia.org/wiki/Penicilina> (Acesso em 12 de agosto,2019)

<https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/8/82/Penicillin-core.png/200px-Penicillin-core.png>>. (Acesso em 12 de agosto,2019)

https://www.researchgate.net/figure/Figura-2-Representacion-de-las-estructuras-tridimensionales-obtenido-das_fig2_26851707 (Acesso em 12 de agosto,2019)

<https://www.biomedicinapadrao.com.br/2011/03/mecanismos-de-acao-dos-wantimicrobianos.html>>.