

630-285
F6792



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

FACULDADE DE AGRONOMIA

**PROGRAMA PÓS - GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA
AGRÍCOLA E DO AMBIENTE**

**AVALIAÇÃO DO EFEITO DE BACTERIOCINAS SOBRE
MICRORGANISMOS ADERENTES A CATETER DE SILICONE**

MARIANA BUSS CEZAR FONTANA

Farmacêutica

Dissertação apresentada como requisito
à obtenção do grau de Mestre em
Microbiologia Agrícola e do Ambiente,
ênfase em Microbiologia do Ambiente

Porto Alegre, Brasil
Novembro de 2002

MARIANA BUSS CEZAR FONTANA
Farmacêutica-Bioquímica

DISSERTAÇÃO

Submetida como parte dos requisitos
para obtenção do Grau de

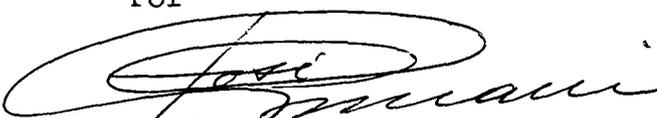
MESTRE EM MICROBIOLOGIA AGRÍCOLA E DO AMBIENTE

Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente
Faculdade de Agronomia
Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Porto Alegre (RS), Brasil

Aprovada em: 28.11.2002
Pela Banca Examinadora

Homologado em: 29/04/2003
Por


ADRIANO BRANDELLI
Orientador-PPG-Microbiologia
Agrícola e do Ambiente


JOSÉ CARLOS GERMANI
Coordenador do Programa de
Pós-Graduação em Microbiologia
Agrícola e do Ambiente


ELIZABETH GLORIA OLIVEIRA BARBOSA DOS SANTOS
Escola Nacional de Saúde Pública - FIOCRUZ


CHRISTINE CLAIRE GAYLARDE
Departamento de Biofísica - UFRGS


AMAURI BRAGA SIMONETTI
ICBS - UFRGS


GILMAR ARDUINO BETTIO MARODIN
Diretor da Faculdade de
Agronomia

ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: Microbiologia do Ambiente

EXECUTOR: Mariana Buss Cezar Fontana
Farmacêutica Bioquímica, aluna do Curso de Microbiologia Agrícola e do Ambiente

ORIENTADOR: Adriano Brandelli Prof. Adjunto do Departamento de Ciência de Alimentos – UFRGS - Doutor em Ciências Químicas.

LOCAL DE EXECUÇÃO: Laboratório de Microbiologia do Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos.

FONTE FINANCIADORA: CAPES

AGRADECIMENTOS

Meus sinceros agradecimentos aos que, junto a mim, empenharam-se no decorrer deste importante trabalho, que certamente abrirá caminho científico na minha carreira profissional.

Contando com a colaboração, amizade, conhecimento e força de cada um dos colegas, Adriane, Delmar, Florência, Geruza, Bacana, Roberta, Alessandro, Amanda, Sílvia, Fabiana, Mercedes, Eduardo e em especial à minha querida amiga Juliana.

Aos meus professores.

Meus sinceros agradecimentos e eterno respeito à Adriano Brandelli, cujo empenho, determinação e conhecimento conduziram-me ao longo desse período a cultivar um espírito científico.

Meus agradecimentos ao Coordenador José Carlos Germani, por todo o apoio.

A esta Universidade Federal do Rio Grande do Sul, bem como todos os funcionários, que me proporcionaram o desenvolvimento deste trabalho, todo o meu carinho e reconhecimento.

A Universidade Federal do Rio de Janeiro.

A CAPES pelo apoio financeiro.

Dedico aos meus Pais, Paulo e Sílvia, à meus irmãos, Marcos e Gustavo.

Ao Lucky.

À minha amada vovó Cecília.

Aos meus tios e primos, em especial meu tio Paulo.

Dedico ao Lorenzo, que com toda sua compreensão e carinho me estimulou neste importante trabalho.

RESUMO

AValiação DO EFEITO DE BACTERIOCINAS SOBRE MICROORGANISMOS ADERENTES A CATETER DE SILICONE¹

Autor: Mariana B. C. Fontana
Orientador: Adriano Brandelli

A incidência de infecções microbianas relacionadas ao uso de cateteres vem aumentando. Uma característica importante dos microrganismos envolvidos é a capacidade de aderência à superfícies com conseguinte formação de colônia, produção de substâncias extracelulares, e subsequente formação de uma matriz compacta, amorfa, de múltiplas camadas, o biofilme. A atividade de bacteriocinas produzidas por *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidermidis* sobre microrganismos isolados de dispositivos intravasculares foi avaliada. As bacteriocinas Pep5 e Epidermina inibiram um maior número de isolados clínicos quando avaliadas in vitro por antagonismo direto, apresentando halos de inibição de 20 a 36 mm. A adição de Pep5 e Epidermina durante o crescimento de *S. epidermidis* e *Corynebacterium* sp resultou na redução do número de células viáveis. O efeito das bacteriocinas sobre a adesão bacteriana à cateteres de silicone foi avaliado através de três protocolos onde variou-se o momento de adição da bacteriocina: (A) simultaneamente, (B) previamente, e (C) posteriormente ao inóculo microbiano. As bacteriocinas Pep5 e Epidermina reduziram significativamente o número de células de *S. epidermidis* e *Corynebacterium* sp. aderidas aos cateteres após 6 h e 12 h de incubação. Não foram observadas diferenças importantes entre os três protocolos A, B, ou C. O efeito de Pep5 sobre *Corynebacterium* sp. foi verificado por microscopia eletrônica de varredura, podendo ser observadas áreas com resíduos celulares na superfície do cateter.

¹ Dissertação de Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente (Microbiologia do Ambiente). Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre (103 p.). Novembro 2002.

ABSTRACT

EVALUATION OF THE EFFECT OF BACTERIOCINS ON MICROORGANISMS ADHERENT TO SILICON CATHETER¹

Author: Mariana B. C. Fontana

Adviser: Adriano Brandelli

The incidence of catheter-related microbial infections has been increasing. One important characteristic of related microorganisms is the adhesion to surfaces with colony formation, production of extracellular substances, and subsequent development of a compact, amorphous, multiple layer matrix, the biofilm. The activity of bacteriocins produced by *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* against microorganisms isolated from intravascular catheters was studied. The bacteriocins Pep5 and Epidermin inhibited a higher number of clinical isolates when evaluated by direct antagonism, showing inhibition zones of 20 to 36 mm. The addition of Pep5 and Epidermin during growth of *S. epidermidis* and *Corynebacterium* sp. resulted in a decrease of viable cell counts. The effect of bacteriocins on bacterial adhesion to silicon catheter was evaluated through three protocols differing in the time of bacteriocin addition: (A) simultaneously, (B) before, and (C) after the microbial inoculum. The bacteriocins Pep5 and Epidermin caused a significant reduction of the number of adhered cells of *S. epidermidis* and *Corynebacterium* sp. after 6 h and 12 h. No important differences among the protocols A, B or C were observed. The effect of Pep5 on *Corynebacterium* sp. was studied by scanning electron microscopy. Sections with cellular residues were observed on the catheter surface.

¹ Master of Science dissertation in Microbiology Agricultural and of the Environment (Microbiology of the Environment). Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre (103 p). November 2002.

SUMÁRIO

RESUMO	IV
ABSTRACT	V
LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS	IX
LISTA DE FIGURAS	X
LISTA DE TABELAS	XII
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	4
3. MATERIAIS E MÉTODOS	22
3.1 Relação e obtenção dos microrganismos	22
3.1.1 Microrganismos produtores de bacteriocinas	22
3.1.1.1 Obtenção da substância antimicrobiana	23
3.1.1.2 Liofilização	23
3.1.2 Microrganismos indicadores	23
3.1.2.1 Identificação	24
3.2 Avaliação da atividade antimicrobiana das bacteriocinas	25
3.3 Avaliação dos isolados indicadores quanto ao poder de aderência sobre superfícies poliméricas	26
3.4 Determinação do número de células viáveis	27

3.5 Densidade Óptica	27
3.6 Bacteriocinas	28
3.6.1 Determinação das unidades arbitrárias	28
3.6.2 Estabilidade térmica	28
3.7 Efeito da bacteriocina no crescimento dos indicadores	29
3.8 Teste <i>in vitro</i> da atividade das bacteriocinas em superfície polimérica	30
3.8.1 Protocolo A	30
3.8.2 Protocolo B	31
3.8.3 Protocolo C	32
3.9 Microscopia eletrônica	33
3.9.1 Fixação	33
3.9.2 Lavagem	34
3.9.3 Desidratação	34
3.9.4 Dessecação	34
3.9.5 Metalização	35
3.9.6 Microscópio Eletrônico	35
3.10 Análise Estatística	35
4. RESULTADOS	36
4.1 Identificação dos Microrganismos	36
4.1.1 Microrganismos Indicadores	36
4.2 Avaliação dos isolados indicadores quanto ao poder de aderência em superfícies poliméricas	37
4.3 Avaliação da atividade antimicrobiana das bacteriocinas	39
4.3.1 Método dos antagonismos direto	39
4.3.2 Método de difusão em ágar com discos	40

4.4 Bacteriocinas	41
4.4.1 Determinação das unidades arbitrárias	41
4.4.2 Estabilidade térmica	41
4.5 Efeito das bacteriocinas sobre o crescimento dos microrganismos indicadores .	43
4.5.1 Efeito e modo de ação de PeP5 durante o crescimento de <i>S. epidermidis</i> ATCC 25923	43
4.5.2 Efeito e modo de ação de PeP5 durante o crescimento de <i>S. epidermidis</i> 634648	44
4.5.3 Efeito e modo de ação de PeP5 durante o crescimento de <i>Corynebacterium</i> spp 633544.....	46
4.5.4 Efeito e modo de ação de Epidermina durante o crescimento de <i>S.</i> <i>epidermidis</i> ATCC 25923	48
4.5.5 Efeito e modo de ação de Epidermina durante o crescimento de <i>S.</i> <i>epidermidis</i> 634648	50
4.5.6 Efeito e modo de ação de Epidermina durante o crescimento de <i>Corynebacterium</i> sp 633544	51
4.6 Teste <i>in vitro</i> da atividade das bacteriocinas em superfícies poliméricas	54
4.6.1 Efeito da Pep5 e Epidermina na formação de biofilme por <i>S. epidermidis</i> ATCC 25923.....	54
4.6.2 Efeito da Pep5 e Epidermina na formação de biofilme por <i>S. epidermidis</i> 634648.....	57
4.6.3 Efeito da Pep5 e Epidermina na formação de biofilme por <i>Corynebacterium</i> sp 633544	60
4.7 Microscopia eletrônica	63
5. DISCUSSÃO	66

6. CONCLUSÕES	71
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	72
APÊNDICE I – Meios utilizados	81
APÊNDICE II – Análise estatística	88

SUMÁRIO

RESUMO	IV
ABSTRACT	V
LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS	IX
LISTA DE FIGURAS	X
LISTA DE TABELAS	XII
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	4
3. MATERIAIS E MÉTODOS	22
3.1 Relação e obtenção dos microrganismos	22
3.1.1 Microrganismos produtores de bacteriocinas	22
3.1.1.1 Obtenção da substância antimicrobiana	23
3.1.1.2 Liofilização	23
3.1.2 Microrganismos indicadores	23
3.1.2.1 Identificação	24
3.2 Avaliação da atividade antimicrobiana das bacteriocinas	25
3.3 Avaliação dos isolados indicadores quanto ao poder de aderência sobre superfícies poliméricas	26
3.4 Determinação do número de células viáveis	27

3.5 Densidade Óptica	27
3.6 Bacteriocinas	28
3.6.1 Determinação das unidades arbitrárias	28
3.6.2 Estabilidade térmica	28
3.7 Efeito da bacteriocina no crescimento dos indicadores	29
3.8 Teste <i>in vitro</i> da atividade das bacteriocinas em superfície polimérica	30
3.8.1 Protocolo A	30
3.8.2 Protocolo B	31
3.8.3 Protocolo C	32
3.9 Microscopia eletrônica	33
3.9.1 Fixação	33
3.9.2 Lavagem	34
3.9.3 Desidratação	34
3.9.4 Dessecação	34
3.9.5 Metalização	35
3.9.6 Microscópio Eletrônico	35
3.10 Análise Estatística	35
4. RESULTADOS	36
4.1 Identificação dos Microrganismos	36
4.1.1 Microrganismos Indicadores	36
4.2 Avaliação dos isolados indicadores quanto ao poder de aderência em superfícies poliméricas	37
4.3 Avaliação da atividade antimicrobiana das bacteriocinas	39
4.3.1 Método dos antagonismos direto	39
4.3.2 Método de difusão em ágar com discos	40

4.4 Bacteriocinas	41
4.4.1 Determinação das unidades arbitrárias	41
4.4.2 Estabilidade térmica	41
4.5 Efeito das bacteriocinas sobre o crescimento dos microrganismos indicadores .	43
4.5.1 Efeito e modo de ação de PeP5 durante o crescimento de <i>S. epidermidis</i> ATCC 25923	43
4.5.2 Efeito e modo de ação de PeP5 durante o crescimento de <i>S. epidermidis</i> 634648	44
4.5.3 Efeito e modo de ação de PeP5 durante o crescimento de <i>Corynebacterium</i> spp 633544.....	46
4.5.4 Efeito e modo de ação de Epidermina durante o crescimento de <i>S.</i> <i>epidermidis</i> ATCC 25923	48
4.5.5 Efeito e modo de ação de Epidermina durante o crescimento de <i>S.</i> <i>epidermidis</i> 634648	50
4.5.6 Efeito e modo de ação de Epidermina durante o crescimento de <i>Corynebacterium</i> sp 633544	51
4.6 Teste <i>in vitro</i> da atividade das bacteriocinas em superfícies poliméricas	54
4.6.1 Efeito da Pep5 e Epidermina na formação de biofilme por <i>S. epidermidis</i> ATCC 25923.....	54
4.6.2 Efeito da Pep5 e Epidermina na formação de biofilme por <i>S. epidermidis</i> 634648.....	57
4.6.3 Efeito da Pep5 e Epidermina na formação de biofilme por <i>Corynebacterium</i> sp 633544	60
4.7 Microscopia eletrônica	63
5. DISCUSSÃO	66

6. CONCLUSÕES	71
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	72
APÊNDICE I – Meios utilizados	81
APÊNDICE II – Análise estatística	88

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

UTI - UNIDADE DE TRATAMENTO INTENSIVO

IPCS-RC - INFECÇÃO PRIMÁRIA DA CORRENTE SANGÜÍNEA RELACIONADA A CATETER

IS - INFECÇÃO SANGÜÍNEA

ICS - INFECÇÃO DA CORRENTE SANGÜÍNEA

PVC - CLORETO DE POLIVINILA

IN - INFECÇÃO NOSOCOMIAL

IRC - INFECÇÃO RELACIONADA A CATETER

UFC - UNIDADE FORMADORA DE COLÔNIA

CONS - ESTAFILOCOCOS COAGULASE – NEGATIVO

CDC - CENTER OF DISEASE CONTROL

EPS – EXOPOLISSACARÍDEO

PIA – POLISSACARÍDEO INTRACELULAR DE ADERÊNCIA

EDTA – ÁCIDO ETILENODIAMINOTETRACÉTICO

ATP - ADENOSINA TRI FOSFATO

BHI – BLOOD HEART INFUSION

EPIL - EPILANCINA

EPIC - EPICIDINA

EPID - EPIDERMINA

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1	Teste de capacidade de aderência dos isolados clínicos em Densidade Ótica.....	38
FIGURA 2	Teste de capacidade de aderência dos isolados clínicos	38
FIGURA 3	Curva de crescimento de <i>S. epidermidis</i> ATCC 25923 na ausência e na presença da PeP5 em UFC/mL.....	43
FIGURA 4	Curva de crescimento de <i>S. epidermidis</i> ATCC 25923 na ausência e na presença da PeP5 em D.O.....	44
FIGURA 5	Curva de crescimento de <i>S. epidermidis</i> 634648 na ausência e na presença da PeP5 em UFC/mL.....	45
FIGURA 6	Curva de crescimento de <i>S. epidermidis</i> 634648 na ausência e na presença da PeP5 em D.O.....	46
FIGURA 7	Curva de crescimento de <i>Corynebacterium sp.</i> 633544 na ausência e na presença da PeP5 em UFC/mL.....	47
FIGURA 8	Curva de crescimento de <i>Corynebacterium sp.</i> 633544 na ausência e na presença da PeP5 em D.O.....	48
FIGURA 9	Curva de crescimento de <i>S. epidermidis</i> ATCC 25923 na ausência e na presença da Epidermina em UFC/mL	49
FIGURA 10	Curva de crescimento de <i>S. epidermidis</i> ATCC 25923 na ausência e na presença da Epidermina em D.O.	49
FIGURA 11	Curva de crescimento de <i>S. epidermidis</i> 634648 na ausência e na presença da Epidermina em UFC/mL	50
FIGURA 12	Curva de crescimento de <i>S. epidermidis</i> 634648 na ausência e na presença da Epidermina em D.O.....	51
FIGURA 13	Curva de crescimento de <i>Corynebacterium sp</i> 633544 na ausência e na presença da Epidermina em UFC/mL.....	52
FIGURA 14	Curva de crescimento de <i>Corynebacterium sp</i> 633544 na ausência e na presença da Epidermina em D.O.....	53
FIGURA 15	Efeito da PeP5 <i>S.epidermidis</i> ATCC 25929 em UFC/mL.....	54

FIGURA 16	Efeito da PeP5 <i>S. epidermidis</i> ATCC 25923 em D.O.....	55
FIGURA 17	Efeito da Epidermina <i>S. epidermidis</i> ATCC 25923 em UFC/mL.....	56
FIGURA 18	Efeito da Epidermina <i>S. epidermidis</i> ATCC 25923 em D.O.....	56
FIGURA 19	Efeito da PeP5 <i>S. epidermidis</i> 634648 em UFC/mL.....	57
FIGURA 20	Efeito da PeP5 <i>S. epidermidis</i> 634648 em D.O.....	58
FIGURA 21	Efeito da Epidermina <i>S. epidermidis</i> 634648 em UFC/mL.....	59
FIGURA 22	Efeito da Epidermina <i>S. epidermidis</i> 634648 em D.O.....	59
FIGURA 23	Efeito da PeP5 <i>Corynebacterium</i> sp. 633544 em UFC/mL.....	60
FIGURA 24	Efeito da PeP5 <i>Corynebacterium</i> sp. 633544 em D.O.....	61
FIGURA 25	Efeito da Epidermina <i>Corynebacterium</i> sp. 633544 em UFC/mL.....	62
FIGURA 26	Efeito da Epidermina <i>Corynebacterium</i> sp. 633544 em D.O.....	62
FIGURA 27	Microscopia Eletrônica de Varredura de compactação celular de <i>Corynebacterium</i> sp. 633544 na superfície externa de cateter de Vialon® após 12 horas de incubação.....	63
FIGURA 28	Microscopia Eletrônica de Varredura do biofilme produzido por <i>Corynebacterium</i> sp. 633544 na superfície externa de cateter de Vialon® após 12 horas de incubação.....	64
FIGURA 29	Microscopia Eletrônica de Varredura do biofilme produzido por <i>Corynebacterium</i> sp. 633544 na superfície externa de cateter de Vialon®, após com tratamento com a bacteriocina PeP5, após 12 horas de incubação.....	65

LISTA DE TABELAS

TABELA 1. Processo de Desidratação	34
TABELA 2. Testes bioquímicos de identificação de microrganismos.....	36
TABELA 3. Halos de inibição pelo Método de antagonismo direto.....	39
TABELA 4. Halos de inibição pelo Método de difusão em ágar com discos, com as bacteriocinas liofilizadas.....	40
TABELA 5. Unidades de Atividade pelo Método de Microtitulação em proporções 1:2	41
TABELA 6. Inativação térmica da Pep5 e Epidermina	42
TABELA 7. Inativação térmica da Pep5 e Epidermina	42
TABELA 8. Inativação térmica da Pep5 e Epidermina	42

1 INTRODUÇÃO

Infecções nosocomiais da corrente sanguínea podem decorrer da utilização de cateteres intravasculares, representando assim um importante risco, influenciando na morbidade e mortalidade de pacientes hospitalizados.

Os cateteres são dispositivos intravasculares produzidos com polímeros sintéticos, largamente utilizados com vários propósitos terapêuticos e diagnósticos, como terapia por infusão, administração de produtos sanguíneos, fluidos e eletrólitos, drogas e suporte nutricional parenteral, além de monitoramento hemodinâmico de pacientes em Centros de Tratamento Intensivo. Estima-se que metade dos pacientes admitidos em hospitais nos Estados Unidos e Europa, irão receber cateter intravascular. Porém, a utilização de cateteres pode resultar em complicações ao paciente, como infecção local e sistêmica.

Sabe-se que as infecções relacionadas a cateter (IRC) e infecções primárias da corrente sanguínea relacionadas a cateter (IPCS-RC) resultam da presença de determinados microrganismos, como estafilococos Coagulase-Negativo (CoNS), seguido de *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans*, enterococos, *P. aeruginosa*, *E. cloacae* entre outros.

A patogenicidade dos microrganismos presentes em cateteres relacionados a infecções da corrente sanguínea é caracterizada pela aderência destes à superfície,

havendo três rotas principais: colonização ao longo da superfície externa do cateter até a extremidade; colonização por contaminação do cateter pela extremidade do local da infusão e pela dispersão dos microrganismos pelo sangue. Há evidências, de muitas investigações, que a aderência aos polímeros é a primeira e mais importante etapa da patogenicidade de corpos estranhos associados a infecções. Aderência à superfície é mediada por mecanismos específicos e não específicos com conseqüente formação de microcolônia, produção de substâncias extracelulares durante o período da colonização, e subseqüente formação de uma matriz compacta, o biofilme.

O propósito da formação do biofilme é proteger os microrganismos do ambiente hostil e agir como armadilha de nutrientes. Os microrganismos formadores de biofilme, dividem-se em dois grupos: as células em estágio plantônico, onde vivem livres como organismos flutuantes individuais e as células em fase séssil, quando aderem à superfície formando o biofilme propriamente dito originando, assim, uma comunidade integrada fechada, com conseqüente formação de uma matriz exopolissacarídica (EPS).

Considerando que a aderência é o fator essencial para a patogênese de corpos estranhos, pesquisas visando prevenir este primeiro passo vêm sendo desenvolvidas. A prevenção da formação do biofilme por ação enzimática, usando lisozima, somada à antibióticos, bem como metodologias para intensificar a penetração dos antibióticos no biofilme, são alternativas estudadas.

Portanto, investigações em nível experimental buscam novos meios para reduzir os índices de infecção de pacientes hospitalizados por cateteres contaminados, através da prevenção da adesão inicial, colonização ou aderência de microrganismos nessas superfícies.

Bacteriocinas são peptídeos microbianos, produzidas por bactérias que causam a morte de microrganismos competidores específicos, sem causar danos a si mesma. Muitos microrganismos produzem diferentes bacteriocinas, denominadas, colicinas, microcinas, lantibióticos e bacteriocinas não lantibióticas, as quais possuem diferentes características moleculares, agem em microrganismos específicos por mecanismos distintos. Embora muitos estudos descrevam a produção e caracterização de diferentes bacteriocinas, muito pouco foi investigado sobre sua ação sobre a aderência de microrganismos em superfícies.

O presente trabalho busca investigar a eficiência das bacteriocinas PeP5 e Epidermina sobre a aderência de microrganismos de importância clínica em superfície polimérica.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

O aumento da expectativa de vida, o acesso aos Centros de Tratamento Intensivo (CTI), tratamentos modernos incluindo o uso de dispositivos intravasculares, são fatores que podem agravar os índices das Infecções Primárias da Corrente Sangüínea Relacionada a Cateteres (IPCS-RC) (CDC, 1997). Os cateteres são dispositivos intravasculares indispensáveis, largamente utilizados em hospitais com diversos fins, como administração de fluidos, medicamentos, produtos sangüíneos, nutrição parenteral e monitoramento hemodinâmico de pacientes com doenças severas. Entretanto, o uso desses recursos intravasculares torna-se complexo devido à incidência de complicações como tromboflebite séptica, endocardite, infecção sangüínea (IS), osteomielite, endoftalmite e artrite. Assim, IPCS-RC aumentam a mortalidade e morbidade em dez a vinte por cento, prolongam a hospitalização em até sete dias ocasionando um custo adicional por paciente (RICHTMANN et al., 1997).

Nos Estados Unidos, há estimativa de ocorrência de duzentas mil infecções nosocomiais relacionadas à Infecção da Corrente Sangüínea (ICS) por ano (MAKI et al., 1994). A maioria das ocorrências nosocomiais situa-se, substancialmente, entre pacientes com dispositivos intravasculares do que em pacientes sem esses dispositivos (JAVIS et al. 1991). A incidência e os fatores potenciais de risco de infecções relacionadas a

dispositivos intravasculares variam consideravelmente com o tipo utilizado e a terapia oferecida (SHERERTZ et al., 1990).

O tipo do dispositivo influi nas taxas de infecção. Há inúmeros tipos de cateteres, como venoso central, venoso periférico, arterial periférico para via pulmonar, venoso central de longo prazo, cateteres associados com implantes no sistema nervoso central para diálise crônica, cateteres para hemodiálise e cateteres para pacientes pediátricos (BRAUNSTEIN, 1985).

O material empregado para a produção do polímero varia conforme as finalidades práticas sendo, em geral constituídos por poliuretano, cloreto de polivinila (PVC), polietileno, silicone ou Teflon. O material sintético de cateter venoso periférico é o silicone, por possuir menor risco de infecção do que o PVC, que atualmente é pouco utilizado (BAND & MAKI, 1980).

Infecção Nosocomial (IN) é a mais importante causa de morbidade em CTI Neonatal sendo primeiramente relacionada a dispositivos sintéticos poliméricos. A manifestação infecciosa está relacionada predominantemente ao Cateter Venoso Central, cuja incidência varia entre cinco a vinte e cinco por cento (DONOWITZ, 1989; GAYNES et al., 1991; GOLDMANN et al., 1981; GOLDMANN et al., 1983; HEMMING et al., 1976).

O espectro de microrganismos causadores IRC depende, primeiramente, dos princípios básicos de higiene do hospital, do material de infusão e das condições do paciente (GARRISON & WILSON, 1994; MERMEL & MAKI, 1994; RAAD et al., 1994).

Há inúmeros métodos de cultura que visam quantificar, buscando associar o número de microrganismos presentes no cateter com a bacteremia do paciente. O método de cultura em placa estabelece qual o tratamento adequado ao paciente, baseado nos resultados obtidos a partir do número de Unidades Formadoras de Colônias (UFC), provenientes da análise microbiológica da ponta do cateter (MAKI et al., 1994).

O diagnóstico das infecções relacionadas a CVC é determinante para aplicar terapia após a retirada do cateter (MAKI et al., 1977). A sensibilidade e especificidade dos métodos microbiológicos para diagnosticar IRC e ISRC dependem do método usado, a remoção do cateter e cultivo em meio de cultura da ponta desse cateter, considera-se o mais eficaz método de cultura quantitativa (SIEGMAN-IGRA et al, 1993).

Para detectar microrganismos localizados na superfície externa ou interna do cateter, os métodos de cultura quantitativa resultam em maior sensibilidade do método de cultura semiquantitativa, onde os cateteres são imergidos em meio salino, ou dispostos em meio de cultura e agitados e/ou sonicados (CLERI et al., 1980; SHERERTZ et al., 1990).

Desde a metade da década de oitenta, uma proporção ascendente de infecções sangüíneas nosocomiais têm sido descritas (MICHELE & PEARSON, 1995).

A infecção por *Staphylococcus aureus* pode levar o paciente a um quadro grave de infecção sangüínea e difusão hematogena a outros locais, resultando em infecções secundárias como osteomielites, abscessos epidurais e endocardites. Geralmente estão relacionados com IRCs vasculares de curto prazo invadindo a extensão do cateter e movendo-se distalmente através da superfície externa deste, interagindo com a corrente sangüínea do paciente (LINARES et al., 1985; MAKI, 1994). Para cateteres de longo

prazo, o modo de infecção é o espalhamento intraluminal a partir do ponto de entrada do cateter contaminado. São menos comumente encontrados em cateteres de silicone do que poliuretano, Teflon e PVC (SHERERTZ, 1995). Os *Staphylococcus aureus* produzem uma variedade de enzimas, como catalase, hialuronidase, nuclease, beta-lactamase e outras, as quais contribuem para o aumento da virulência (WALDVOGEL, 1995). A incidência de IPCS-RC, por *S. aureus* em hospitais aumentou significativamente durante a década de oitenta (BANNERJEE et al., 1991). De quinze a vinte por cento de infecções sangüíneas nosocomiais são causadas por *S. aureus* (MAKI, 1981). Em estudos isolados sobre a virulência desse microrganismo, foi constatado que em quase metade dos casos com decorrência de morte relacionando infecção por cateter, o agente biológico principal foi *S. aureus* (JERNIGNAN & FARR, 1993).

Durante os últimos anos CoNS vêm se destacado como importantes patógenos, afligindo principalmente pacientes que utilizam algum tipo de dispositivo sintético (PFALLER & HERWALDI, 1988; VUONG & OTTO, 2002).

CoNS são morfologicamente similares ao *Staphylococcus aureus*, possuindo uma variedade de propriedades de virulência em comum. Entretanto, produzem menor número de substâncias extracelulares, o que reduz o seu potencial de patogenicidade em relação ao *S. aureus*. Esta substância extracelular se relaciona com a aderência à superfícies de corpos estranhos, ocasionando a colonização exacerbada, levando à infecções, sendo que muitas espécies são hemolíticas e algumas possuem uma cápsula antifagocítica. Mesmo tendo a flora epitelial e membranas da mucosa humana como habitat característico, e não se comportando como hospedeiro patogênico, são considerados agentes infecciosos especiais, pois possuem a habilidade de aderirem e

acumularem -se nas superfícies de polímeros (cateteres), e produzirem substância extracelular, desencadeando infecção nosocomial (CHRISTENSEN et al., 1983; DAVENPORT et al., 1986).

CoNS variam em relação ao potencial de patogenicidade (PFALLER & HERWALDI, 1988). Aproximadamente, de trinta a quarenta por cento das infecções relacionadas a CVC são causadas por CoNS e espécies de CoNS são isolados em cerca de oito por cento a quarenta por cento de cateteres removidos (RUPP & ARCHER, 1994). Entretanto, somente uma pequena parte desses cateteres irão se tornar fonte de bacteremia (WIDMER, 1993).

A maioria dos isolados de CoNS como fonte clinicamente significativa refere-se à *S. epidermidis* (VUONG & OTTO, 2002). Destacando-se como um agente muito comum no desenvolvimento de bacteremia, geralmente se introduz pelo epitélio não íntegro, atingindo a corrente sanguínea e desencadeando uma infecção. *S. epidermidis* é conhecido como o principal causador de endocardite, pois é encontrado em válvulas do coração íntegro e de próteses intravasculares, incluindo cateteres e válvulas artificiais cardíacas. Em pacientes imunodeprimidos ou neutropênicos é considerado um risco, pois são indivíduos que utilizam largamente dispositivos sintéticos como auxílio terapêutico. Por terem tornado-se resistentes a muitos antibióticos, essas infecções são muito sérias e podem ser fatais (PFALLER & HERWALDI, 1988).

Bastonetes Gram-negativos como *Escherichia coli*, *Enterobacter* spp., *Klebsiella* spp., *Serratia* spp., *Pseudomonas aeruginosa* e *Acinetobacter* spp. têm se mostrado importantes agentes de bacteremia polimicrobiana (de seis a quatorze por cento) com significativo aumento na mortalidade (REUBEN et al., 1989; WEINSTEIN et al., 1986).

Os membros da família Enterobacteriaceae são considerados o maior grupo de microrganismos Gram negativos envolvidos em infecções nosocomiais, incluindo ICS e IRC (GROEGER et al., 1993; MERMEL & MAKI, 1994). Dentre eles os que predominam são *P. aeruginosa* e outros bastonetes Gram negativos não fermentativos (JAVIS & MARTONE, 1992).

Escherichia coli é um agente causador de bacteremia, sendo considerado o agente Gram negativo mais infeccioso e que está mais freqüentemente relacionado com infecções do trato urinário. Índices que variam entre trinta e um e quarenta e sete por cento são relatados, surpreendendo o fato de não ser significativo seu número em infecções sangüíneas relacionadas a dispositivos (GRANSDEN et al., 1990; JAVIS & MARTONE, 1992).

Dentre os microrganismos Gram negativos mais comumente causadores de infecções sangüíneas são *Klebsiella* spp. e *P. aeruginosa*, seguidas por *Enterobacter* (CHOW et al., 1991; ROBERTS et al., 1991) e *Enterobacter cloacae* cujas fontes de bacteremia mais comuns são CVC (15%) e cateteres do trato biliar (18%) (GALLAGHER, 1990). Outra fonte associada a bacteremia é a de produtos intravasculares contaminados (BUCHHOLZ et al., 1971).

A *Klebsiella* se destaca entre as Gram-negativas por sua alta incidência em ocorrências de bacteremia, cerca de onze a dezesseis por cento (BRYAN et al., 1983). Geralmente, bacteremias causadas por esse agente estão associadas ao choque séptico, sendo as portas de entrada mais comuns a via urinária, via respiratória e o trato biliar, apenas quatro por cento por via de dispositivos (GARCÍA DE LA TORRE et al., 1985).

Serratia spp. caracteriza-se por ocasionar bacteremia em pacientes hospitalizados por longos períodos. As principais portas de entrada para esse agente são os tratos respiratório e urinário e ferimentos cirúrgicos. De dois a nove por cento das infecções estão relacionadas a esse agente (BOUZA et. al., 1987).

Pseudomonas aeruginosa é um agente encontrado na água, solo e em plantas; também é colonizador da pele humana e membranas mucosas, especialmente de pacientes hospitalizados. A capacidade da *P. aeruginosa* suportar condições ambientais adversas, pode ter contribuído para ser incluído como um importante patógeno nosocomial. Os reservatórios hospitalares de *P. aeruginosa* são equipamentos respiratórios, fluidos para administração intravascular, soluções oftálmicas, detergentes e desinfetantes (POLLACK, 1995). *P. aeruginosa* é um dos patógenos mais predominantes entre os Gram negativos causadores de IRC, associada à vários tipos de cateteres intravasculares. Devido a esse fato, recentemente foi considerado pelo CDC, o sexto agente patogênico causador de infecções relacionado a ICS nosocomial em pacientes em UTI's (JAVIS & MARTONE, 1992). Um estudo revela a alta taxa de mortalidade vinculada à infecção por *P. aeruginosa* adquirida em hospitais, variando em níveis entre cinquenta a oitenta por cento (FLICK & CLUFF, 1976).

Infecção nosocomial por *Acinetobacter baumannii* é caracterizada por atingir pacientes com doenças severas em UTIs, relacionando-se com infecções dos tratos respiratório e urinário, inflamação nas meninges e bacteremia (BECK- SAGUÉ et al., 1990; SIEGMAN-IGRA et al., 1993). Dados relatam que a porta de entrada para desenvolvimento de bacteremia por *A. baumannii* são dispositivos intravasculares (45%), seguidos por infecção no trato respiratório (31%) e infecção na pele (4%). O

índice de mortalidade é de quarenta e quatro por cento, variando entre vinte e um por cento em pacientes com ISRCs e cem por cento em pacientes com pneumonia. Justificando a alta porcentagem de casos de IRCs, *A. baumannii* é o mais significativo representante dos microrganismos Gram negativos (SEIFERT et al., 1995).

Outros representantes importantes entre os bastonetes Gram negativos incluem *Aeromonas hydrophila*, *Bordetella* spp, *Achromobacter* spp, *Moraxella osloensis*, *Kingella kingae* e *Haemophilus influenza*.

Nas últimas cinco décadas ocorreram mudanças nos agentes causadores de infecção hospitalar e na tecnologia usada no tratamento na prevenção. Estudos epidemiológicos relatam um aumento nas infecções nosocomiais causadas por fungos, ressaltando as infecções sangüíneas, sendo muitas vezes relacionadas a cateteres vasculares (HAMORY, 1987).

As ocorrências de infecções nosocomiais por fungos patógenos variou entre 1980 a 1990 de seis para dez por cento, sendo que a porcentagem de ICS nosocomial causada por fungo foi de cinco por cento para nove por cento nesse mesmo período (PITTET, 1993).

A mortalidade por fungos relacionados à ICS é significativa. Levantamentos epidemiológicos demonstram que pacientes com fungemia são mais propensos ao óbito durante a hospitalização dos pacientes com ICS causada por agentes não fúngicos (MILLER & WENZEL, 1987).

A partir de dados da literatura médica, constata-se que nos últimos anos a incidência de fungemias nosocomiais aumentou consideravelmente, devido ao

envolvimento de espécies de *Candida*, relacionada a cateteres intravasculares (BECK-SAGUÉ et al., 1999), porém, outras espécies são consideradas importantes clinicamente, como *Alternaria* spp., *Aspergillus niger*, *Fusarium* spp., *Malassezia furfur*, *Nocardia* spp., *Paecilomyces* spp., *Saccharomyces cerevisiae* e *Torulopsis globrata* (HAMORY, 1987).

Quando um dispositivo médico, cateter venoso central/periférico, cateteres do trato urinário ou válvulas cardíacas, está contaminado com algum tipo de microrganismo existem variáveis que irão determinar o desenvolvimento de um biofilme (PITTET, 1993).

As bactérias estão presentes nos ambientes como células livres, suspensas no ar ou água, associadas a tecidos humanos ou animal, ou como membros de uma comunidade multiespecífica complexa, os biofilmes (COSTERTON et al., 1987). Atualmente reconhece-se que a maioria das bactérias encontradas em condições naturais ou em equipamentos clínicos ou industriais existem em associações com superfícies (COSTERTON et al., 1987).

Os biofilmes são geralmente constituídos por diferentes espécies de microrganismos e formam-se sobre uma grande variedade de superfícies tais como dentes, epitélios, grãos de areia, alimentos, cateteres, plásticos e aço inoxidável dentre outros (WATNICK & KOLTER, 2000).

Um biofilme é definido como uma população de microrganismos compactados sob a forma de uma matriz sobre uma superfície qualquer, em quase todos os ecossistemas. Pode ser formado por uma grande variedade de microrganismo, no qual desenvolvem seu próprio micro ambiente, possibilitando a sobrevivência, mesmo em

um meio adverso (COSTERTON et al., 1995; MARCHALL, 1992; NIVENS et al., 1995).

No processo de formação de um biofilme há dois grupos distintos de microrganismos, dependendo da fase de crescimento em que se encontra; plantônicos e sésseis (FLETCHER, 1991). No estágio plantônico os microrganismos vivem como organismos livres, enquanto que no estágio sésseis as células se encontram aderidas à superfície, formando um biofilme e interagindo como uma comunidade integrada (GENIGEORGIS, 1995).

A formação do biofilme ocorre em duas etapas bem definidas. Primeiramente o microrganismo adere-se por tempo suficiente à superfície exposta para a interação tornar-se irreversível. O índice de células aderidas depende do número e tipo de células no líquido no qual o cateter é exposto, dependendo também da razão de vazão do líquido no dispositivo e das características físico-químicas da superfície. Os componentes do meio líquido podem alterar as propriedades da superfície e afetar a taxa de células fixadas. Essas células uma vez aderidas irreversivelmente produzem um polissacarídeo extracelular que evolui para um biofilme. O grau de crescimento celular está diretamente influenciado pelo fluxo e composição química do meio, também concentração de drogas antimicrobianas e temperatura do ambiente (COSTERTON et al., 1995).

A aderência da célula ao polímero ocorre em duas etapas. A reversível, onde as células estão próximas à superfície, porém não estão em contato com a superfície, que é mediada por forças eletrostáticas, por interações hidrofóbicas e forças de van der Waals. A irreversível se caracteriza por apresentar forças dipolo-dipolo, hidrofóbicas, ion-dipolo, ligações covalentes e interações do tipo pontes de hidrogênio. O modelo

termodinâmico da adesão celular a uma superfície sólida imerso em meio líquido releva parâmetros como tensão superficial do polímero, o meio líquido envolvido e a célula bacteriana propriamente dita. Sendo o meio líquido sangue, soro ou plasma, imediatamente algumas proteínas são adsorvidas pelo polímero, como albumina, o que resulta em alterações nas características físico-químicas da superfície (COTTONARO et al., 1981), afetando assim, fatores específicos de aderência. Outras proteínas que favorecem a aderência específica a determinadas células ao polímero, mesmo em presença da albumina, são fibrinogênio, fibronectina, laminina, colágeno, trombospondina e vitronectina (HERRMANN et al., 1991; WATTS et al., 1990). Os mecanismos de ligação se caracterizam por forças específicas, envolvendo determinadas proteínas plasmáticas e uma matriz extracelular (PITTET, 1993).

Transpondo a rápida aderência inicial, verifica-se o segundo passo da colonização que é determinada pelo acúmulo à superfície do polímero, com subsequente crescimento, replicação, formação de micro colônia e formação de uma substância viscosa extracelular, um exopolissacarídeo (EPS), resultando em uma estrutura amorfa de múltiplas células, dispostas em camadas embebidas em tal substância extracelular. O EPS facilita o ataque celular inicial à superfície, forma e mantém a micro colônia, confere a estrutura do biofilme, amplia a resistência do biofilme frente ao estresse do ambiente e à exposição antimicrobiana e também possibilita a captura de nutrientes (COSTERTON et al., 1995). O polissacarídeo extracelular é composto por homo e heteropolissacarídeos, contendo glicose, frutose, manose, galactose, piruvato e ácido manurônico ou ácido glicurônico (GENIGEORGIS, 1995; JOHANSEN & FALHOLT, 1997). A aderência intercelular é mediada por um polissacarídeo, encontrado na camada extracelular viscosa, denominado Polissacarídeo Intracelular de Aderência (PIA),

conferindo a habilidade de formar biofilme sob a superfície (MACK et al., 1996a). Recentemente descoberta, a estrutura química do PIA se caracteriza por ter ligação linear β -1,6-glicosamino-glicana (MACK et al., 1996b).

As células de um biofilme são na maioria aeróbicas quando fazem parte de um biofilme aeróbico, porém, microrganismos anaeróbicos também são encontrados. Dependendo do local de colonização, alguns microrganismos podem ser exauridos de oxigênio e nutrientes; o reduzido consumo e a limitação da difusão do oxigênio para o interior do biofilme, resulta em uma zona anoxigênica, explicando o fato de microrganismos aeróbicos e anaeróbicos compartilharem o mesmo ambiente (GENIGEORGIS, 1995).

Recentes estudos demonstraram que os biofilmes têm uma estrutura porosa formada por tubos capilares, dentro dos quais água e nutrientes são distribuídos (COSTERTON et al., 1995). O transporte de nutrientes para o interior do biofilme ocorre por capilares especiais. O resíduo celular é excretado através do sistema para a superfície externa da estrutura celular (COSTERTON et al., 1995).

Sabe-se que as células microbianas são distribuídas de maneira heterogênea no biofilme e somente dez a vinte por cento do volume total do biofilme são células, o restante são polissacarídeos (COSTERTON et al., 1994).

A arquitetura do biofilme é específica à espécie quando esse é constituído por apenas um tipo de cepa e específico ao substrato quando há mais de uma cultura. Em biofilmes heterogêneos, a arquitetura é geralmente irregular, o que é consequência de formas de crescimento e aderência distintos entre as espécies que o constituem (COSTERTON et al., 1995).

A prevenção da formação do biofilme se torna importante por razões médicas e econômicas. Muitas alternativas vêm sendo estudadas sendo o primeiro fator considerado a elaboração de materiais resistentes à aderência e subsequente colonização. Outra possibilidade, o tipo de material do dispositivo e seu modo de inserção e por fim, a terceira alternativa viável e utilizada até então, é a administração de antibióticos durante a utilização de cateteres venosos centrais. Existem alternativas em relação à técnica de colocar no dispositivo uma solução de antibiótico ou deixar uma solução antibiótica dentro do cateter entre as utilizações (JANSEN, 1993).

Nos últimos anos estudos têm se voltado para a redução da aderência de microrganismos patogênicos em cateteres, voltada ao desenvolvimento de materiais que impeçam a fixação microbiana à superfície do dispositivo, mesmo após inserção desse na corrente sanguínea, considerando-se também as possíveis interações entre os fatores expressos pelo hospedeiro, como proteínas e células. O modo de realização dessa alternativa se dá pela ligação à superfície do cateter de drogas antimicrobianas como, antibióticos, desinfetantes e metais. A droga é ligada à superfície diretamente ou incorporada ao polímero e a partir do momento que este entra em contato com o ambiente aquoso, libera concentrações da droga nas regiões mais próximas. A liberação ocorre de acordo com a primeira Lei da Cinética, liberando inicialmente uma maior concentração e, após, diminuindo exponencialmente (JANSEN & KOHNEM, 1995; KOHNEM et al., 1994).

Esses avanços buscam especialmente, a prevenção da ocorrência de infecções relacionada a cateteres quando a origem de contaminação for durante a inserção (ARNOW et al., 1993). Muitas pesquisas relatam a maior eficiência do antibiótico, se

incorporado ao material do que se ligado covalentemente por reações químicas. Exemplos de antibióticos usados são: ciprofloxacina, clindamicina, dicloxacilina, vancomicina e teicoplanina (WELCH, 1978).

Aminoglicosídeos como canamicina, cefalotin e cefoxitin têm sido incorporados a polímeros hidrofílicos como polietileno e silicone, e avaliados clinicamente e experimentalmente. Resultados efetivos foram obtidos com cateteres do trato urinário, associados à infecções (SOLOVSKJ et al., 1993). Desinfetantes como iodo e Irgasan foram incorporados a polímeros com resultados satisfatórios para tal objetivo (SOLOVSKJ et al., 1993). Entre os metais com atividade antimicrobiana e caracteristicamente com baixa toxicidade, destaca-se a prata (SIOHANSI, 1994; MCLEAN et al., 1993).

A heparina é comumente ligada à superfície externa de cateteres Swan-Ganz para diminuir sua trombogenicidade, evidenciando menor ocorrência de infecção relacionada ao cateter, em função da atividade preventiva à aderência (HOAR et al., 1981).

As bacteriocinas foram descobertas em 1925, quando pesquisadores observaram a inibição de *Escherichia coli* por *Escherichia coli* V. A substância produzida por *Escherichia coli* V foi, então, denominada de colicina (TAGG et al., 1976).

As bacteriocinas são peptídeos biologicamente ativos, produzidas por bactérias, que possuem atividade antimicrobiana, geralmente contra bactérias que são estritamente relacionadas às espécies produtoras dessas substâncias (TAGG et al., 1976).

A atividade dessas substâncias parece estar associada à presença de uma porção rotéica ativa, com atividade bactericida, com ação através da ligação a receptores específicos na parede celular dos microrganismos sensíveis (TAGG et al., 1976).

Dentre as bactérias lácticas produtoras de bacteriocinas temos: *Lactobacillus acidophilus* N2 (Lactacina B); *Lactobacillus johnsonii* VPI 11088 (Lactacina F); *Pediococcus acidilactici* F (Pediocina Ach); *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* ATCC 1454 (Nisina) e *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CNRZ 481 (Lacticina 481) (NES et al., 1995), entre outros.

Segundo Nes et al. (1995) as bacteriocinas são classificadas com base nos dados de estrutura primária, peso molecular e estabilidade térmica. A Classe I compreende os antibióticos, os quais se caracterizam por serem peptídeos pequenos, menores que 5 kDa, estáveis quando submetidos a temperaturas altas, possuem aminoácidos com anéis de éter intramolecularmente, como lantionina e β -etil-lantionina. São subdivididos em tipo IA, quando são peptídeos catiônicos capazes de formarem poros na membrana citoplasmática do microrganismo sensível e tipo IB que são peptídeos com característica globular e inibem enzimas.

Na classe II os peptídeos são pequenos, porém, com tamanho maior que os da classe I, sendo observados valores menores que 10 kDa. São estáveis quando aquecidos. Possui os subgrupos IIA, com peptídeos ativos contra *Listeria* spp.; IIB, formado por bacteriocinas cuja ação depende da atividade complementar de dois peptídeos, denominados de complexo formador de esporos; IIC, composto por bacteriocinas Sec-dependentes e IID, compreendendo as bacteriocinas que não foram incluídas em nenhum subgrupo definido.

incorporado ao material do que se ligado covalentemente por reações químicas. Exemplos de antibióticos usados são: ciprofloxacina, clindamicina, dicloxacilina, vancomicina e teicoplanina (WELCH, 1978).

Aminoglicosídeos como canamicina, cefalotin e cefoxitin têm sido incorporados a polímeros hidrofílicos como polietileno e silicone, e avaliados clínica e experimentalmente. Resultados efetivos foram obtidos com cateteres do trato urinário, associados à infecções (SOLOVSKJ et al., 1993). Desinfetantes como iodo e Irgasan foram incorporados a polímeros com resultados satisfatórios para tal objetivo (SOLOVSKJ et al., 1993). Entre os metais com atividade antimicrobiana e caracteristicamente com baixa toxicidade, destaca-se a prata (SIOHANSI, 1994; MCLEAN et al., 1993).

A heparina é comumente ligada à superfície externa de cateteres Swan-Ganz para diminuir sua trombogenicidade, evidenciando menor ocorrência de infecção relacionada a cateter, em função da atividade preventiva à aderência (HOAR et al., 1981).

As bacteriocinas foram descobertas em 1925, quando pesquisadores observaram a inibição de *Escherichia coli* por *Escherichia coli* V. A substância produzida por *Escherichia coli* V foi, então, denominada de colicina (TAGG et al., 1976).

As bacteriocinas são peptídeos biologicamente ativos, produzidas por bactérias, que possuem atividade antimicrobiana, geralmente contra bactérias que são estritamente relacionadas às espécies produtoras dessas substâncias (TAGG et al., 1976).

A atividade dessas substâncias parece estar associada à presença de uma porção protéica ativa, com atividade bactericida, com ação através da ligação a receptores específicos na parede celular dos microrganismos sensíveis (TAGG et al., 1976).

Dentre as bactérias lácticas produtoras de bacteriocinas temos: *Lactobacillus acidophilus* N2 (Lactacina B); *Lactobacillus johnsonii* VPI 11088 (Lactacina F); *Pediococcus acidilactici* F (Pediocina Ach); *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* ATCC 11454 (Nisina) e *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CNRZ 481 (Lacticina 481) (NES et al., 1995), entre outros.

Segundo Nes et al. (1995) as bacteriocinas são classificadas com base nos dados de estrutura primária, peso molecular e estabilidade térmica. A Classe I compreende os lantibióticos, os quais se caracterizam por serem peptídeos pequenos, menores que 5 KDa, estáveis quando submetidos a temperaturas altas, possuem aminoácidos com anéis tioéter intramolecularmente, como lantionina e β -etil-lantionina. São subdivididos em tipo IA, quando são peptídeos catiônicos capazes de formarem poros na membrana citoplasmática do microrganismo sensível e tipo IB que são peptídeos com característica globular e inibem enzimas.

Na classe II os peptídeos são pequenos, porém, com tamanho maior que os da classe I, sendo observados valores menores que 10 KDa. São estáveis quando aquecidos. Possui os subgrupos IIA, com peptídeos ativos contra *Listeria* spp.; IIB, formado por bacteriocinas cuja ação depende da atividade complementar de dois peptídeos, denominados de complexo formador de esporos; IIC, composto por bacteriocinas Sec-dependentes e IID, compreendendo as bacteriocinas que não foram incluídas em nenhum subgrupo definido.

Na classe III são caracterizados por possuírem peso molecular maior, cerca de 30 KDa e por serem sensíveis ao calor, como por exemplo, helveticina J, helveticina VI829, acidophilina A e lactacina A e B.

Considerando a estrutura primária um fator de classificação, um quarto grupo compreende substâncias compostas por unidades protéicas, lipídicas e glicídicas pode ser incluído (JIMÉNEZ-DIAZ et al., 1993).

Por terem natureza protéica, as bacteriocinas são sintetizadas pelo mecanismo ribossomal igual à síntese de proteínas (DE VUYST & VANDAMME, 1994). Observa-se que a biossíntese da maioria das bacteriocinas produzidas por bactérias lácticas manifesta características da cinética de metabólitos primários (DE VUYST & VANDAMME, 1991; DE VUYST & VANDAMME, 1992).

A ação dessas substâncias sobre as células sensíveis ocorre em duas etapas; na primeira fase, as bacteriocinas adsorvem-se através de receptores específicos e não específicos da célula hospedeira; neste estágio essas substâncias são sensíveis às proteases. Em uma segunda fase, irreversível, as bacteriocinas originam alterações celulares nas células sensíveis, de acordo com o seu modo específico de ação (TAGG et al., 1976).

A atividade das bacteriocinas não depende de sua adsorção específica à superfície de células sensíveis, mas também da adsorção inespecífica que deriva de sua natureza hidrofóbica. A imunidade das linhagens resistentes às bacteriocinas deve-se mais a produção de enzimas envolvidas na imunidade, que na alteração de receptores (PIARD & DESMAZEUD, 1992).

Das bacteriocinas mais conhecidas, sabe-se que a nisina, bacteriocina produzida por *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, atua como despolarizante das membranas bacterianas, produzindo poros na bicamada lipídica (TAGG et al., 1976). Quanto ao modo de ação da nisina, estudos indicam que tal substância liga-se fortemente aos fosfolipídios da membrana. As moléculas catiônicas da nisina interagem com os fosfolipídios aniônicos, reorientando-os, fazendo com que formem poros ou canais iônicos não seletivos. Através dos poros tem-se o fluxo de íons potássio, Adenosina Tri Fosfato (ATP) e aminoácidos, resultando na destruição da membrana e perda dos constituintes celulares (COSTERTON, 1995).

A quantidade de bacteriocinas necessárias para realizar um nível específico de morte para um microrganismo pode ser maior ou menor, dependendo do tipo de microrganismo alvo, assim como das bacteriocinas utilizadas, as quais têm modos de ação distintos (JACK & JUNG, 2000).

Algumas linhagens de *Staphylococcus epidermidis* produzem lantibióticos, contendo peptídeos extremamente estáveis, como Epidermina, Epilancina K7 ou PeP5. Tem sido proposto que essas substâncias podem ser importantes na competição bacteriana e que a produção de lantibióticos seja restrita ao *S. epidermidis* entre estafilococos (JACK & JUNG, 2000).

Epidermina, PeP5 e Epilancina K7 são produzidas por *Staphylococcus epidermidis* (BIERBAUM et al., 1996a). PeP5 é um peptídeo antimicrobiano de 34 aminoácidos, que contém um de aminoácido raro com ligação tioéter lantionina e/ou metilantionina, as quais formam uma estrutura de três anéis intramoleculares (BIERBAUM et al., 1996b). A Epidermina é um peptídeo antibiótico, que é distinguido

pela presença do aminoácido lantionina raro, que contém pontes sulfídicas e ácidos alfa-beta-dideidroaminoácido (VAN DE VEEN & JUNG, 1996).

Durante os últimos anos, a atenção tem sido destinada ao desenvolvimento de barreiras antimicrobianas a fim de se prevenir primeiramente a adesão inicial de microrganismos contaminantes, através da aplicação de agentes antimicrobianos às superfícies, do que a remoção das células depois de aderidas. A idéia é que tanto a presença do agente com sua atividade antimicrobiana mantidas na interface eliminem as células sensíveis ou os esporos que têm a tendência à adesão. Nisina tem sido utilizada diretamente na superfície de alimentos como um aditivo na inibição do crescimento de células Gram-positivas e esporos (BOWER et al., 1998).

Em dispositivos biomédicos, existem estudos relacionando substâncias antimicrobianas, como a nisina, os quais demonstram que a atividade antimicrobiana dessa é altamente dependente do tempo de contato desta substância com o cateter, da concentração da solução e do tempo de aderência celular à superfície (BOWER et al., 1998).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

A parte experimental desta dissertação foi realizada no Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e Departamento de Microbiologia Geral da Universidade Federal do Rio de Janeiro.

3.1 Relação e obtenção dos microrganismos

3.1.1 Microrganismos produtores de bacteriocinas

Como microrganismos produtores de bacteriocinas foram utilizadas diferentes linhagens de *Staphylococcus* spp., envolvidas em mastite bovina, as quais foram testadas para produção de substâncias antimicrobianas. Também foram usadas linhagem de *Staphylococcus aureus* provenientes de leite pasteurizado (NASCIMENTO et al., 2002).

As bacteriocinas usadas foram: A53, A70, 146L, 215FN, MB92 (produzidas por *S. aureus*), Pep5, epidermina, epilancina K7 e epicidina 280 (produzidas por *S. epidermidis*).

Os sobrenadantes de cultura contendo as bacteriocinas PeP5 e Epidermina foram gentilmente cedidas pelo Departamento de Microbiologia da Universidade Federal do Rio de Janeiro.

3.1.1.1 Obtenção da substância antimicrobiana

Para a extração da substância antimicrobiana foram coletados 20 mL do cultivo de 24 horas em BHI a partir de um inóculo de aproximadamente 10^6 UFC/mL, o qual foi submetido a agitação em estufa incubadora, da marca Nova Técnica 101. O material coletado foi centrifugado a 10.000 g por 15 minutos a 15°C , objetivando a separação das células produtoras do sobrenadante, em centrífuga Hermle Z 323K, Hermle Labortechnik GmbH. Posteriormente verificou-se o pH (valores entre 7,0-7,5), e logo após filtrou-se em filtros com dimensões de $0,22\mu\text{m}$ de marca Millipore.

3.1.1.2 Liofilização

Após o processo de centrifugação, filtração determinação do pH, foram distribuídas alíquotas de um 1 mL em frascos para liofilizar, antes do processo de liofilização as alíquotas foram mantidas a -76°C durante 24 horas.

As alíquotas foram liofilizadas no Departamento de Genética da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

3.1.2 Microrganismos indicadores

Como microrganismos indicadores, foram utilizados isolados clínicos de cateteres de silicone provenientes de pacientes que necessitaram de tratamento com

antibióticos após a retirada do dispositivo. Os microrganismos foram obtidos junto ao Setor de Microbiologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

Os microrganismos indicadores foram isolados de pontas de cateter, utilizando-se a técnica de esgotamento em Placa de Petri contendo ágar sangue, seguido pela identificação automática (Sistema VITEK). Uma alçada de material biológico foi coletado e inoculado em caldo BHI, incubado a 37°C por 24 horas e após foram transferidos para Placas de Petri contendo ágar BHI. As colônias foram observadas quanto à estrutura morfológica celular, coloração e superfície.

Das bactérias isoladas, foram mantidas as identificações do Hospital de Clínicas de Porto Alegre: *Bulkholderia cepacea* 650415, *Staphylococcus epidermidis* 632636 S8, *Staphylococcus epidermidis* 632636 S9, *Staphylococcus aureus* 658801, *Staphylococcus aureus* 618450, *Corynebacterium* sp 633544, *Staphylococcus epidermidis* 635685, *Staphylococcus epidermidis* 634648, *Staphylococcus epidermidis* 641889, *Staphylococcus epidermidis* 650057 e *Pseudomonas aeruginosa* 656573. Além dos isolados clínicos foi testada uma bactéria de coleção: *Staphylococcus epidermidis* ATCC 25923.

Todos os procedimentos de manipulação de microrganismos foram realizados em Câmara de Fluxo Laminar Vertical modelo PA 115, Pachane Indústrias e Comércio Ltda.

3.1.2.1 Identificação

Os isolados clínicos foram identificados através da análise de suas características bioquímicas e morfológicas, após foram confirmados pelo sistema de identificação automática.

Foram utilizados os seguintes testes: motilidade, urease, citrato, liquefação de gelatina, Voges Proskauer, redução de nitrato, glicose, hemólise, catalase, maltose, glicose, lactose, sacarose, trealose, salicina, arginina, indol, oxidação de dextrose, crescimento em Mac Conkey, oxidase, crescimento em ágar cetrimida, teste O/F, coagulase, manitol (MAC FADDIN, 2000).

Para a avaliação morfológica utilizou-se a técnica de coloração de Gram, com auxílio de microscópio óptico Olympus, modelo CX40.

3.2 Avaliação da atividade antimicrobiana das bacteriocinas

A avaliação inicial da atividade antimicrobiana das bacteriocinas A53, A70, 146L, 215FN, MB92, Pep5, epidermina, epilancina K7 e epicidina 280 foi realizada no Departamento de Microbiologia Geral da Universidade Federal do Rio de Janeiro, segundo o protocolo modificado de Giambiagi-de-Marval et al. (1990), onde as linhagens produtoras de bacteriocinas foram cultivadas em 3 mL de meio BHI a 37°C por 18 horas; 10µL de cada cultura foram inoculados na forma de pontos na superfície de uma placa contendo BHI. Após um período de 18 horas a 37°C, as bactérias foram mortas por exposição a vapores de clorofórmio por 30 min. e, sobre a placa, verteu-se 3 mL de meio BHI semi-sólido acrescido de alíquotas de 0,3 mL da linhagem indicadora (previamente crescida por 24 horas a 37°C, em 3 mL de meio BHI). As placas foram reincubadas a 37°C por 18 horas e, após essa incubação, os diâmetros dos halos das zonas de inibição foram medidos. Foram realizadas 4 repetições do experimento.

Após a triagem inicial, as bacteriocinas foram selecionadas, e os sobrenadantes obtidos, os quais foram liofilizados e testados pelo método de difusão em ágar com discos de celulose (Whatman nº 3M). As suspensões bacterianas (cultivo de 24 hs, 37°C em 3 mL BHI) foram distribuídas homogeneamente com swab estéril em Placas de Petri contendo ágar BHI. Foram adicionados discos de celulose de seis milímetros esterilizados, através dos quais aplicou-se 20µL das bacteriocinas liofilizadas ressuspendidas em água destilada. Após a incubação por 24 horas a temperatura de 37°C em Estufa Bacteriológica modelo JP 101 da empresa Prolab realizou-se a leitura de halos de inibição ao redor dos discos com auxílio de régua milimetrada (KIMURA et al. 1998)

3.3 Avaliação dos isolados indicadores quanto a aderência sobre superfícies poliméricas

Os corpos de prova foram preparados da seguinte maneira: os cateteres foram cortados sob condições estéreis, com auxílio de tesoura e pinça estéreis, a partir de uma amostra íntegra e estéril de cateteres intravenosos com dispositivo de proteção 22GA 100 IN estéreis com dimensões de 0,9 x 25 mm e vazão 35 mL/min constituídos de Vialon®, um biomaterial constituído de silicone, termosensível hemocompatível, tromboresistente, ultraflexível inerte, cedidos pela empresa Becton Dickinson indústrias cirúrgicas. Foram preparados pré inóculos dos microrganismos indicadores, os quais foram incubados em tubos de ensaio com 3mL de caldo BHI por 24 horas a temperatura de 37°C, e 1 mL deste cultivo foi adicionado aos corpos de prova, os quais se

encontravam imersos em 3 mL de caldo BHI estéril. Os tubos de ensaio foram então incubados por 24 horas a 37°C para permitir o crescimento com subsequente colonização ao longo da superfície externa e interna do dispositivo. Decorrido o período de 24 horas, os corpos de prova foram transferidos a um outro tubo de ensaio contendo 3 mL de solução salina 0,87%, objetivando a remoção das células fracamente aderidas à superfície, logo após, os cateteres lavados foram novamente transferidos o outro tubo de ensaio contendo 3 mL de solução salina 0,87%, para ser submetido a sonicação por 3 ciclos de 3 minutos cada com frequência de 40KHz, em sonicador Ultrasonic Cleaner modelo USC 700, Thornton Unique, o que viabiliza a remoção das células fortemente aderidas à superfície. Foram realizadas 3 repetições do experimento.

Os resultados são expressos em UFC/mm² considerando a área da superfície interna e externa do cateter (área total = 125,7 mm²).

3.4 Determinação do número de células viáveis

As populações bacterianas foram determinadas pelo número das Unidades Formadoras de Colônias (UFC/mL), através do método em gota, o qual utilizou-se para cada diluição das suspensões bacterianas obtidas após a lavagem e sonicação dos cateteres, três alíquotas de 20 µL, como descrito por Sangali e Brandelli (2000).

3.5 Densidade óptica

Para a determinação da densidade ótica as suspensões bacterianas foram analisadas em Espectrofotômetro Hitachi U1100, a 600nm.

3.6 Bacteriocinas

3.6.1 Determinação das unidades arbitrárias

Os sobrenadantes das culturas produtoras obtidas como descrito em 3.1.1.1, e liofilizadas foram diluídos em Placas de microtitulação em proporções de 1:2 em solução salina 0,87%, em diluições até 1/256.

Utilizou-se 20 μ L das frações diluídas para realizar o teste de inibição, pelo método de difusão em discos. As placas contendo ágar BHI, foram previamente preparadas, inoculando-se com as culturas indicadoras *Staphylococcus epidermidis* ATCC 25923, *Corynebacterium* sp 633544, *Staphylococcus epidermidis* 634648. Após o período de incubação de 24 horas à 37°C, as placas foram avaliadas quanto a presença de halos de inibição. O protocolo foi realizado em triplicata.

A unidade arbitrária é definida como a recíproca da maior diluição em que foi verificado halo (MOTTA & BRANDELLI, 2002).

3.6.2 Estabilidade térmica

Foi avaliado o efeito da temperatura sobre a atividade antimicrobiana de Pep5 e Epidermina (bacteriocinas selecionadas). Alíquotas do sobrenadante liofilizado de PeP5 e Epidermina, conforme descrito em 3.1.1.2, foram ressuspensa em 100 μ L de água previamente esterilizada e submetidas a diferentes temperaturas em equipamento Thermomix[®] BM 18 BU, B.Braun Biotech International.

O processo para avaliar o efeito da temperatura foi feito com a incubação por 15 minutos a 40°C, 50°C, 60°C, 70°C, 80°C, 90°C, 30 minutos a 90°C e 121°C por 15 minutos. As frações pré-tratadas foram testadas pelo teste em difusão em discos, conforme descrito em 3.2. O teste envolveu uma alíquota liofilizada, não tratada, para fins de controle. O teste foi realizado em triplicata.

O microrganismo utilizado como indicador foi *Corynebacterium* sp.

3.7 Efeito da Bacteriocina no crescimento dos microrganismos indicadores

Neste experimento buscou-se verificar a sensibilidade de *S. epidermidis* 634648, *S. epidermidis* ATCC 25923 e *Corynebacterium* sp. 633544, durante o seu crescimento, às bacteriocinas PeP5 e Epidermina.

Os pré-inóculos dos microrganismos indicadores foram preparados em frascos Erlenmeyer com 50 mL de meio BHI, incubando em estufa a 37°C por 18 horas. Após o período 1% do pré-inóculo foi inoculado em frascos Erlenmeyer contendo 100mL de meio BHI, sendo o experimento realizado em quatro repetições. Para controle utilizou-se um cultivo das bactérias indicadoras, sem adição das bacteriocinas.

Para o cultivo controle, a cultura indicadora foi inoculada em meio BHI e em intervalos regulares de 2 horas, alíquotas foram coletadas para acompanhamento da absorbância, determinada em espectrofotômetro (600nm) e contagem do número de unidades formadoras de colônias por mililitro (UFC/mL). Para determinação de UFC/mL, foi utilizado o método descrito em 3.3.

Para o cultivo teste procedeu-se como para o cultivo controle, porém, após 2 horas de incubação, um volume de bacteriocina equivalente a 640UA/mL, foi

adicionado às culturas indicadoras, e o efeito da bacteriocina foi acompanhado em intervalos regulares de 2 horas, sendo o experimento realizado durante 12 horas. Foi feito o acompanhamento da absorbância (600nm) em espectrofotômetro e determinação do número de UFC/mL. Os resultados foram comparados àqueles da cultura controle, sem adição de bacteriocina.

3.8 Teste *in vitro* da atividade das bacteriocinas em superfície polimérica

Para a avaliação da atividade antimicrobiana das bacteriocinas *in vitro* foram testados três protocolos distintos.

3.8.1 Protocolo A

Em 20 tubos de ensaio foram adicionados 3 mL caldo BHI estéril, incorporados os corpos de prova com dimensões descritas anteriormente, inoculados 1 mL do pré-inóculo dos microrganismos selecionados: *S. epidermidis* ATCC 25923 ou *S. epidermidis* 634648 ou *Corynebacterium* sp. 633544, com densidade óptica e UFC/mL iniciais conhecidos, e adicionados um volume de equivalente a 640 UA/mL das bacteriocinas PeP5 ou Epidermina, ou BHI como controle negativo da ação antimicrobiana. Os tubos de ensaio foram incubados a 37°C em estufa bacteriológica.

Após seis horas de incubação, os cateteres de 10 tubos (5 com bacteriocina e 5 sem bacteriocina) foram, individualmente, transferidos para outro tubo de ensaio contendo solução salina 0,87% e logo após, esses cateteres foram novamente transferidos para um terceiro tubo contendo solução salina 0,87% para sofrer sonicação

por 3 ciclos de 3 minutos cada com frequência de 40KHz. A partir dessa solução, foram determinados as UFC/mL e densidade óptica a 600nm.

Após doze horas de incubação, os cateteres dos outros 10 tubos (5 com bacteriocina e 5 sem bacteriocina) ainda incubados foram, individualmente, transferidos para outro tubo de ensaio contendo solução salina 0,87% e logo após, esses cateteres foram novamente transferidos para um terceiro tubo contendo solução salina 0,87% para sofrer sonicação por 3 ciclos de 3 minutos cada com frequência de 40KHz, em sonicador Ultrasonic Cleaner modelo USC 700, Thornton Unique. A partir dessa solução, foram determinados as UFC/mL e densidade óptica a 600nm.

3.8.2 Protocolo B

Em 20 tubos de ensaio foram incorporados os corpos de prova com dimensões descritas anteriormente, os quais sofreram uma pré- sensibilização em 2 mL das soluções contendo as bacteriocinas PeP5 ou Epidermina, ou BHI como controle negativo da ação antimicrobiana por 2 horas sob condições estéreis a temperatura ambiente. Os corpos de prova foram transferidos a um segundo tubo de ensaio contendo 3 mL de caldo BHI estéril, onde foram inoculados 1 mL dos pré- inóculos de *S. epidermidis* ATCC 25923 ou *S. epidermidis* 634648 ou *Corynebacterium* sp. 633544 com densidade óptica e UFC/mL iniciais conhecidos. Após 3 horas de contato, a temperatura ambiente, em condições estéreis, os corpos de prova foram transferidos a um terceiro tubo de ensaio contendo apenas 3 mL de caldo BHI estéril, os quais foram incubados a 37°C em estufa bacteriológica.

Após seis horas de incubação, os cateteres de 10 tubos (5 com bacteriocina e 5 sem bacteriocina) foram, individualmente, transferidos para outro tubo de ensaio contendo solução salina 0,87% e logo após, esses cateteres foram novamente transferidos para um terceiro tubo contendo solução salina 0,87% para sofrer sonicação por 3 ciclos de 3 minutos cada com frequência de 40KHz. A partir dessa solução, foram determinados as UFC/mL e densidade óptica a 600nm.

Após doze horas de incubação, os cateteres do outros 10 tubos (5 com bacteriocina e 5 sem bacteriocina) ainda incubados foram, individualmente, transferidos para outro tubo de ensaio contendo solução salina 0,87% e logo após, esses cateteres foram novamente transferidos para um terceiro tubo contendo solução salina 0,87% para sofrer sonicação por 3 ciclos de 3 minutos cada com frequência de 40KHz, em sonicador Ultrasonic Cleaner modelo USC 700, Thornton Unique. A partir dessa solução, foram determinados as UFC/mL e densidade óptica a 600nm. Este protocolo foi similar ao descrito por Bower et al. (1998).

3.8.3 Protocolo C

Em 20 tubos de ensaio foram adicionados 3 mL de caldo BHI estéril, incorporados corpos de prova, dimensões descritas anteriormente, inoculados 1 mL dos pré- inóculos de *S. epidermidis* ATCC 25923 ou *S. epidermidis* 634648 ou *Corynebacterium* sp. 633544 com densidade óptica e UFC/mL iniciais conhecidos. Os tubos de ensaio foram incubados a 37°C por 3 horas em estufa bacteriológica. Transcorrido esse período, os corpos de prova foram transferidos para outro tubo de

ensaio contendo caldo BHI estéril, e um volume equivalente a 640 UA/mL de PeP 5 ou Epidermina, ou BHI, como controle negativo da ação antimicrobiana.

Após seis horas de incubação, os cateteres de 10 tubos (5 com bacteriocina e 5 sem bacteriocina) foram, individualmente, transferidos para outro tubo de ensaio contendo solução salina 0,87% e logo após, esses cateteres foram novamente transferidos para um terceiro tubo contendo solução salina 0,87% para sofrer sonicação por 3 ciclos de 3 minutos cada com frequência de 40KHz. A partir dessa solução, foram determinados as UFC/mL e densidade óptica a 600nm.

Após doze horas de incubação, os cateteres do outros 10 tubos (5 com bacteriocina e 5 sem bacteriocina) ainda incubados foram, individualmente, transferidos para outro tubo de ensaio contendo solução salina 0,87% e logo após, esses cateteres foram novamente transferidos para um terceiro tubo contendo solução salina 0,87% para sofrer sonicação por 3 ciclos de 3 minutos cada com frequência de 40KHz, em sonicador Ultrasonic Cleaner modelo USC 700, Thornton Unique. A partir dessa solução, foram determinados as UFC/mL e densidade óptica a 600nm.

3.9 Microscopia Eletrônica

Realizou-se microscopia eletrônica de varredura no Centro de Microscopia Eletrônica, na Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

3.9.1 Fixação

Os cateteres foram incubados por 24 horas a temperatura ambiente em BHI contendo a bactéria indicadora em presença ou ausência de bacteriocina. O fixador

utilizado foi 1,2 mL de glutaraldeído 25%, 5 mL de tampão fosfato 0,1 M e 3,8 mL de água destilada. Após as 24 horas de incubação transferiu-se o material a ser analisado a um tubo de ensaio contendo a solução fixadora por um período de sete dias.

3.9.2 Lavagem

Após o período de fixação, o material foi lavado por três vezes, 30 minutos cada, em solução de tampão fosfato 0,1 M e água destilada (1:1).

3.9.3 Desidratação

O processo de desidratação consta com a exposição dos corpos de prova de uma maneira lenta e gradual de concentrações crescentes de acetona:

TABELA 1: Processo de desidratação

Acetona 30%	10 min
Acetona 50%	10 min
Acetona 70%	10 min
Acetona 90%	10 min
Acetona 90%	20 min
Acetona 100%	10 min
Acetona 100%	20 min

3.9.4 Dessecação

O processo de dessecação foi realizado no equipamento *Critical Point Dryer* (Balzers CPD030).

Após o ponto crítico o material foi transferido e adaptado a *stubs*, com o auxílio de uma lupa.

3.9.5 Metalização

Essa etapa foi realizada na Metalizadora, que torna o material condutivo por meio de deposição de ouro e platina sobre a amostra. Foi utilizado o *sputter Cater* da *Balzers SCD050*.

3.9.6 Microscópio Eletrônico

Essa etapa foi realizada no Centro de Microscopia Eletrônica, utilizando o Microscopio Eletrônico de Varredura, JSM 5800, da marca Jeol.

3.10 Análise Estatística

O delineamento experimental utilizado foi o completamente casualizado. Os resultados das curvas de crescimento e testes de adesão à cateter foram expressos na forma de média e desvio padrão. Para avaliar diferença significativa entre tratamentos nas curvas de crescimento e nos experimentos de adesão à cateter foi realizado o teste de Kruskal-Wallis. Os resultados estão descritos no Apêndice II.

4 RESULTADOS

4.1 Identificação dos Microrganismos

4.1.1 Microrganismos Indicadores

Os resultados dos testes bioquímicos de identificação dos microrganismos indicadores estão sumarizados na TABELA 2.

TABELA 2. Testes bioquímicos de identificação de microrganismos.

Microrganismo	Cat	Nit	O/F	Hem	Coa	Gel	Man
<i>S. epidermidis</i> ATCC 25923	+	+	F	-	-	-	-
<i>S. epidermidis</i> 632636 S8	+	+	F	-	-	-	-
<i>S. epidermidis</i> 632636 S9	+	+	F	-	-	-	-
<i>S. epidermidis</i> 635685	+	+	F	-	-	-	-
<i>S. epidermidis</i> 634648	+	+	F	-	-	-	-
<i>S. epidermidis</i> 641889	+	+	F	-	-	-	-
<i>S. epidermidis</i> 650057	+	+	F	-	-	-	-
<i>S. epidermidis</i> 658801	+	+	F	-	-	-	-
<i>S. aureus</i> 658801	+	+	F	-	+	+	+
<i>S. aureus</i> 648450	+	+	F	-	+	+	+
	Dex	Mcc	Ox	Mot	Gel	Cet	
<i>Bulkholderia cepacea</i> 650415	+	+	+	+	+	+	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 656573	+	+	+	+	+	+	

+, positivo; -, negativo; F, fermentador; Cat, catalase; Nit, redução de nitratos; OF, teste O/F; Hem, hemólise; Coa, coagulase; Gel, liquefação de gelatina; Man, manitol; Dex, oxidação de dextrose; Mcc, crescimento em Mac Conkey; Ox, oxidase; Mot, motilidade; Cet, crescimento em ágar cetrimida.

4.2 Avaliação dos isolados indicadores quanto a capacidade de aderência em superfícies

Para a avaliação do poder de aderência celular em superfícies poliméricas, foram testados os seguintes microrganismos: *S. epidermidis* 634648, 641889, 635685, 650057, 632636 S8, 632636 S9, *S. aureus* 658801 e 658801, *Corynebacterium* sp. 633544, *P. aeruginosa* 656573, *Burkholderia cepacea* 650415 e *Candida* sp. 633544.

Os valores de densidade óptica após sonicação dos cateteres podem ser observados na FIGURA 1. Nota-se que o isolado *P. aeruginosa* 656573 destaca-se, seguido de *Candida* sp. 656047 e *S. epidermidis* 634648.

Quanto à contagem das UFC/mm² os valores mais elevados foram observados com *P. aeruginosa* 656573, *Candida* sp. 656047, e *Corynebacterium* sp. 633544 (FIGURA 2). Entre os isolados clínicos de *S. epidermidis* testados quanto a capacidade de aderência a cateteres, *S. epidermidis* 634648, apresentou o maior potencial.

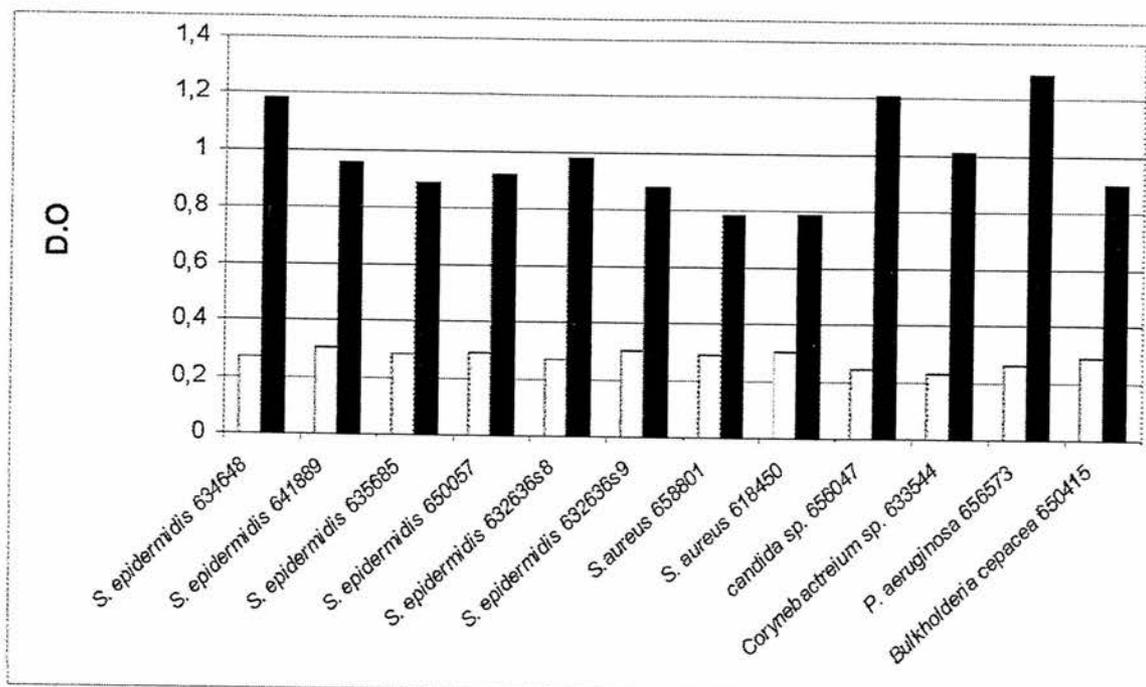


FIGURA 1: Teste de capacidade de aderência dos isolados clínicos em Densidade Ótica. (□) Inóculo inicial – (■) Correspondente a células aderidas, após 24 horas de incubação e sonicação.

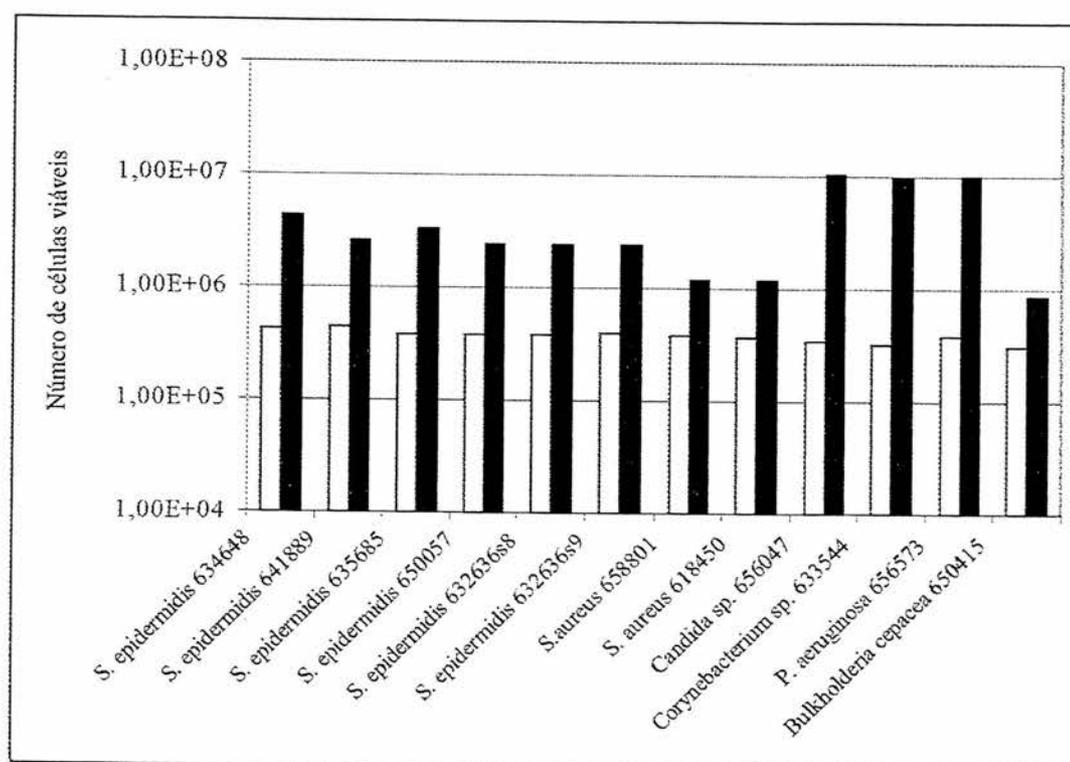


FIGURA 2: Teste de capacidade de aderência dos isolados clínicos. (□) Inóculo inicial em UFC/mL, (■) Correspondente a células aderidas, após 24 horas de incubação e sonicação em UFC/mm².

4.3. Avaliação da atividade antimicrobiana das bacteriocinas

4.3.1. Método do antagonismo direto

Foram testadas a ação antimicrobiana das bacteriocinas A53, A70, 215FN, 146L, MB92, PeP5, Epicidina, Epilancina e Epidermina.

Na TABELA 3 estão os valores dos halos de inibição em milímetros obtidos para as bactérias: *S. epidermidis* 634648, 641889, 635685, 650057, 632636 S8, 632636 S9, *S. aureus* 658801, e 618450, *Candida* sp. 656047, *Corynebacterium* sp. 633544, *P. aeruginosa* 656573 e *Bulkholderia cepacea* 650415.

TABELA 3: Halos de inibição pelo Método de antagonismo direto.

INDICADORAS	BACTERIOCINAS								
	A53	A70	215FN	146L	MB92	PeP5	Epil.	Epic.	Epid.
<i>S. epidermidis</i> 634648	17	18	-	20	-	27	-	-	20
<i>S. epidermidis</i> 641889	-	-	-	-	-	-	-	-	23
<i>S. epidermidis</i> 635685	-	-	-	-	-	31	-	-	-
<i>S. epidermidis</i> 650057	-	-	-	-	-	32	-	-	-
<i>S. epidermidis</i> 632636 S8	-	-	-	-	-	31	-	-	-
<i>S. epidermidis</i> 632636 S9	19	27	-	-	-	30	-	-	-
<i>S. aureus</i> 658801	-	16	-	-	-	23	-	-	21
<i>S. aureus</i> 648450	-	-	-	-	-	27	-	-	-
<i>B. cepacea</i> 650415	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Candida</i> sp. 656047	22	23	-	-	-	-	-	-	-
<i>Corynebacterium</i> sp. 633544	-	-	-	-	-	-	-	-	36
<i>P. aeruginosa</i> 656573	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Valores dos halos de inibição em mm, (-) ausência de halos

A partir dos resultados da avaliação da atividade antimicrobiana das bacteriocinas pelo protocolo modificado de Giambiagi-de-Marval et al. (1990), determinou-se que entre as bacteriocinas testadas, a PeP5 apresentou efetividade frente

a um maior número de isolados. Pode-se observar que entre os isolados clínicos avaliados *S. epidermidis* 634648, foi inibido por um maior número de bacteriocinas.

Destaca-se a sensibilidade de *Corynebacterium* sp. 633544, quando testado contra Epidermina, resultando num halo de 36 mm. A partir dos resultados da avaliação da atividade antimicrobiana por antagonismo direto, as bacteriocinas mais efetivas foram PeP5 e a Epidermina, demonstrando halos inibitórios com maior diâmetro, sendo assim fator determinante na escolha de tais substâncias, para a liofilização subsequente.

4.3.2. Método de difusão em ágar com discos

Na TABELA 4, estão os valores dos halos de inibição em mm de diâmetro, obtidos quando testadas as bactérias: *S. epidermidis* 634648, *S. epidermidis* ATCC 25923, *S. aureus* 658801, *Bulkholderia cepacea* 650415, *Corynebacterium* sp. 633544 e *Pseudomonas aeruginosa* 656573 frente a ação das bacteriocinas selecionadas Epidermina e PeP5. Observou-se que *S. epidermidis* ATCC 25923, uma bactéria de controle, foi sensível à Epidermina e à PeP5.

TABELA 4: Halos de inibição pelo método de difusão em ágar com discos, com as bacteriocinas liofilizadas.

MICRORGANISMO	BACTERIOCINA	
	Epidermina	Pep5
<i>S. epidermidis</i> 634648	14	13
<i>S. epidermidis</i> ATCC 25923	16	13
<i>S. aureus</i> 658801	13	14
<i>B. cepacea</i> 650415	-	-
<i>Corynebacterium</i> sp. 633544	14	13
<i>P.aeruginosa</i> 656573	-	8

Valores dos halos em mm, (-) ausência de halo.

Entre os isolados clínicos, observou-se que *Corynebacterium* sp. 633544 e *S. epidermidis* 634648 demonstraram-se sensíveis tanto à ação antimicrobiana da PeP5 quanto à da Epidermina liofilizadas, apresentando como diâmetro dos halos 14mm e 13mm, respectivamente.

4.4. Bacteriocinas

4.4.1. Determinação das unidades arbitrárias

Para a determinação das Unidades de Atividade por mililitro de PeP5 e Epidermina, foram utilizados como microrganismos indicadores *Corynebacterium* sp. 633544, *S. aureus* 658801, *S. epidermidis* 634648 e *S. epidermidis* ATCC 25923.

Na TABELA 5 pode-se observar os resultados obtidos para cada bacteriocina testada.

TABELA 5: Unidades de Atividade pelo Método de Microtitulação

MICRORGANISMOS INDICADORES	UNIDADES ARBITRÁRIAS	
	PeP5	Epidermina
<i>Corynebacterium</i> sp. 633544	3200	3200
<i>Staphylococcus aureus</i> 658801	1600	3200
<i>Staphylococcus epidermidis</i> 634648	3200	1600
<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 25923	3200	3200

4.4.2. Estabilidade térmica

Para a avaliação da estabilidade térmica foi utilizado como microrganismo indicador *Corynebacterium* sp. 633544. As bacteriocinas testadas foram PeP5 e Epidermina.

Pode-se observar nas TABELAS 6, 7 e 8 e atividade inibitória da bacteriocina, e constatar que as bacteriocinas PeP5 e Epidermina mantiveram suas atividades quando tratada até 64°C por 17 minutos.

TABELA 6: Inativação térmica de PeP 5 e Epidermina

HALOS EM MM		
TEMPERATURAS	PeP5	Epidermina
40°C	15	14
50°C	15	14
60°C	14	13
70°C	0	0
80°C	0	0
90°C	0	0
90°C (30min)	0	0
121°C	0	0

TABELA 7: Inativação térmica de PeP 5 e Epidermina

HALOS EM MM		
TEMPERATURAS	PeP5	Epidermina
62°C	14	14
64°C	14	14
66°C	0	0
68°C	0	0

TABELA 8: Inativação térmica de PeP 5 e Epidermina

Temperatura a 64°C	
Tempo em min	Halos em mm
15	14
16	14
17	14
18	0
19	0
20	0

4.5. Efeito das bacteriocinas sobre o crescimento dos microrganismos indicadores

4.5.1. Efeito de PeP5 durante o crescimento de *S. epidermidis* ATCC 25923

Para avaliar o efeito de PeP5 no crescimento de *S. epidermidis* ATCC 25923, realizou-se uma curva de crescimento de 12 horas, com pontos em intervalos de 2 horas para a obtenção dos dados de Densidade Óptica e UFC/mL.

A FIGURA 3 ilustra os resultados das curvas de crescimento em presença e ausência da bacteriocina em valores de UFC/mL. Observa-se redução significativa no crescimento a partir da quarta hora, na curva onde adicionou-se a PeP5.

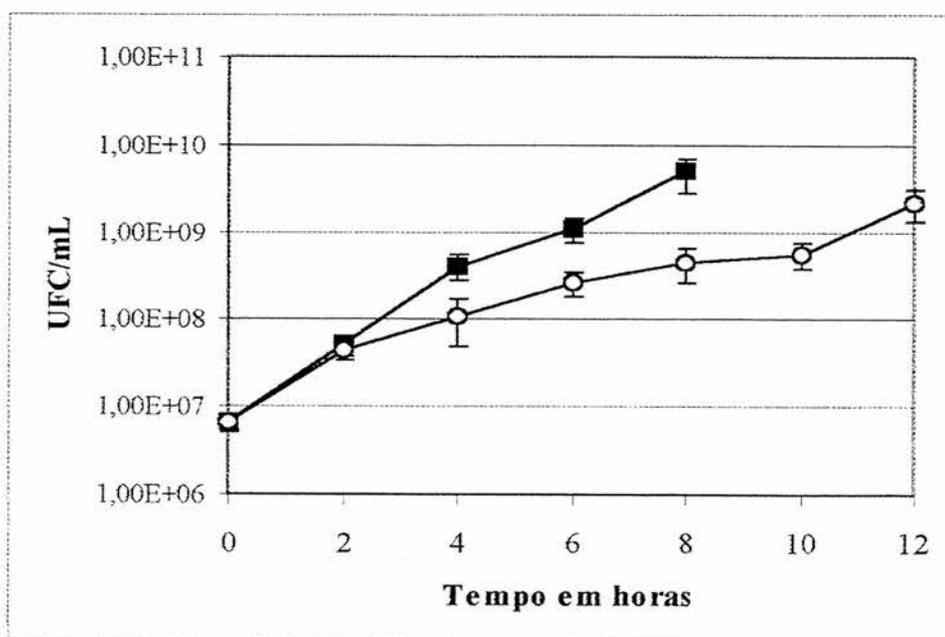


FIGURA 3: Curva de crescimento de *S. epidermidis* ATCC 25923 na ausência (■) e na presença (○) da PeP5 em UFC/mL. Cada ponto representa a média \pm desvio padrão de quatro determinações. Pontos 10 e 12 h sem Pep5, UFC/mL > 1,0E+10.

A FIGURA 4 ilustra as curvas de crescimento de *S. epidermidis* ATCC 25923 na presença ou ausência de PeP5. Pode-se observar que a bacteriocina diminuiu o crescimento a partir da quarta hora, embora as curvas tenham comportamento similar.

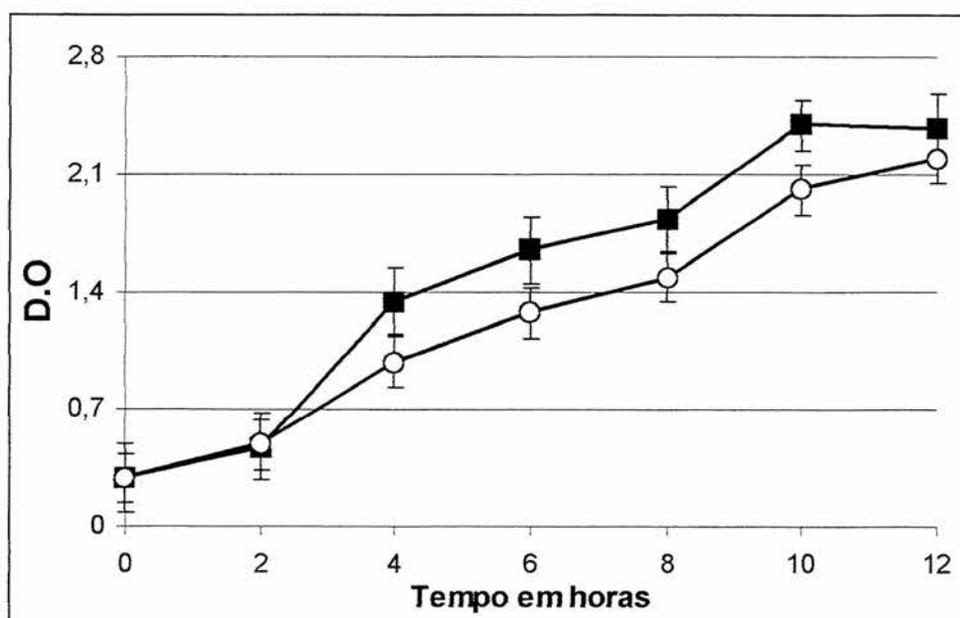


FIGURA 4: Curva de crescimento de *S. epidermidis* ATCC 25923 na ausência (■) e na presença (○) da PeP5 em D.O. Cada ponto representa a média \pm desvio padrão de quatro determinações.

4.5.2. Efeito de PeP5 durante o crescimento de *S. epidermidis* 634648

Para avaliar o efeito de PeP5 no crescimento de *S. epidermidis* 634648, realizou-se uma curva de crescimento de 12 horas. Com pontos em intervalos de 2 hs para a obtenção dos dados de Densidade Óptica e UFC/mL.

Na FIGURA 5, ilustra-se a ação da PeP5 sobre a indicadora em UFC/mL. A bacteriocina mostrou-se com atividade inibitória sobre *S. epidermidis* 634648 a partir da quarta hora, mas principalmente a partir da hora 10.

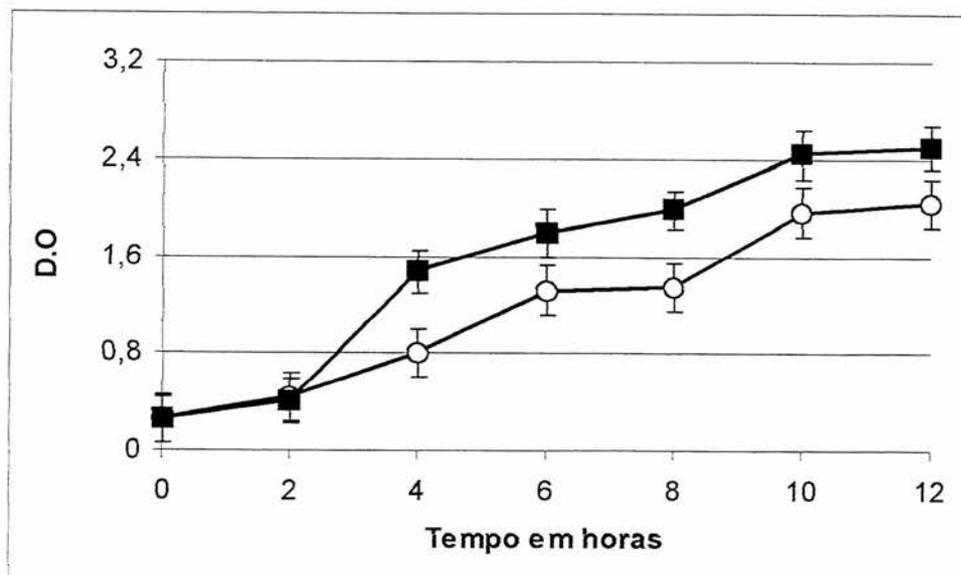


FIGURA 6: Curva de crescimento de *S. epidermidis* 634648 na ausência (■) e na presença (○) da PeP5 em D.O. Cada ponto representa a média \pm desvio padrão de quatro determinações.

4.5.3. Efeito de Pep5 durante o crescimento de *Corynebacterium* sp. 633544

Para avaliar o efeito de PeP5 no crescimento de *Corynebacterium* sp. 633544, realizou-se uma curva de crescimento padrão de 12 horas. Com pontos em intervalos de 2 horas para a obtenção dos dados de Densidade Óptica e UFC/mL. Pode-se observar na FIGURA 7, a diminuição nos valores de UFC/mL na curva em presença da PeP5, principalmente em a partir de 10 horas de incubação.

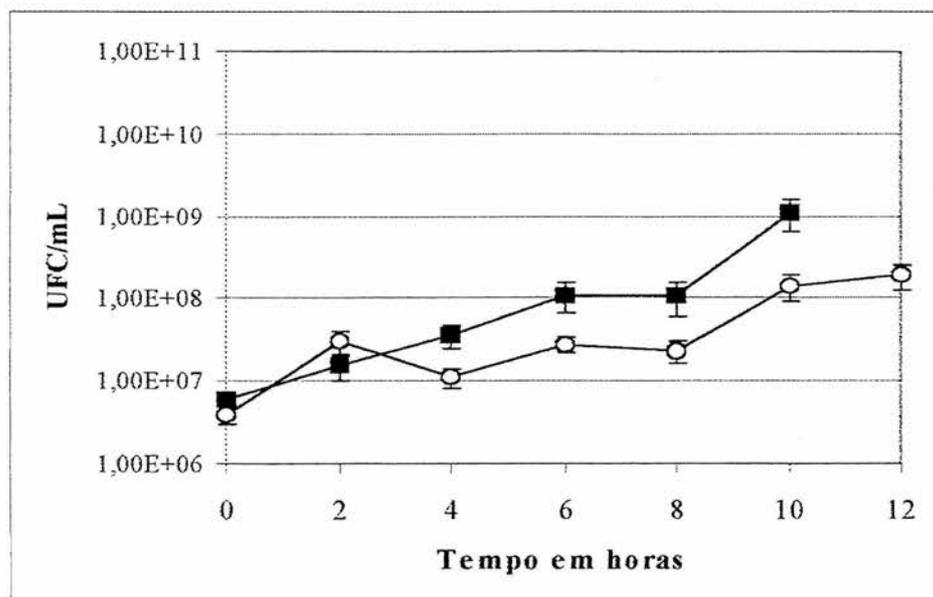


FIGURA 7: Curva de crescimento de *Corynebacterium* sp. 633544 na ausência (■) e na presença (○) da PeP5 em UFC/mL. Cada ponto representa a média \pm desvio padrão de quatro determinações. Ponto 12 h semm Pep5, UFC/mL $> 1,0E+10$.

Na FIGURA 8 observa-se que os valores da densidade óptica na curva em presença de PeP5 mantem-se praticamente constantes.

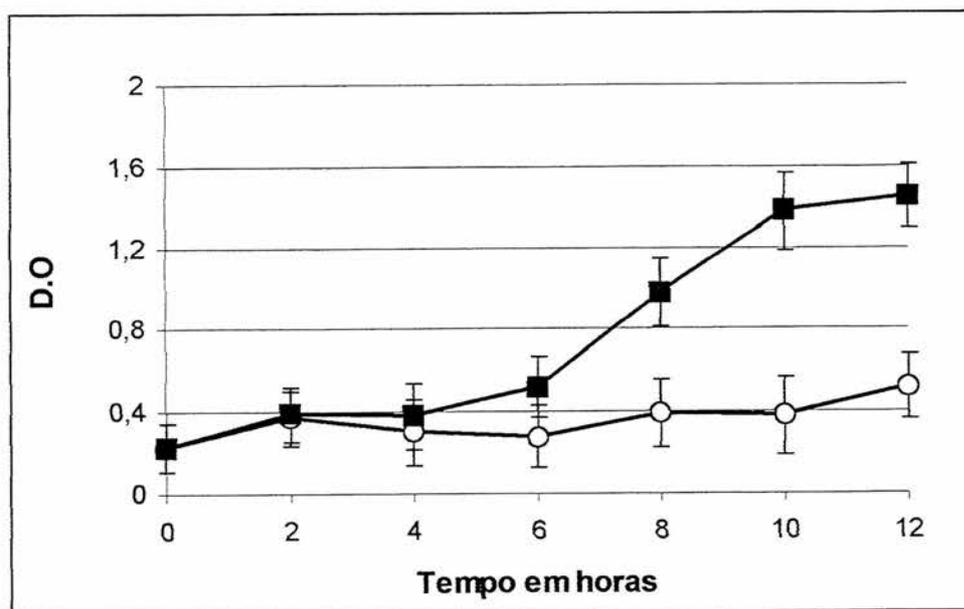


FIGURA 8: Curva de crescimento de *Corynebacterium* sp. 633544 na ausência (■) e na presença (○) da PeP5 em D.O. Cada ponto representa a média \pm desvio padrão de quatro determinações.

4.5.4. Efeito de Epidermina durante o crescimento de *S. epidermidis* ATCC 25923

Para avaliar o efeito da Epidermina sobre o crescimento de *S. epidermidis* ATCC 25923, realizou-se uma curva de crescimento de 12 horas. Com pontos em intervalos de 2 horas para a obtenção dos dados de Densidade Óptica e UFC/mL.

A FIGURA 9, ilustra os resultados das curvas de crescimento em valores de UFC/mL, podendo-se observar um comportamento similar no crescimento em ambas as curvas, com apenas uma diminuição do número de células viáveis na curva com bacteriocina em 10 horas de incubação.

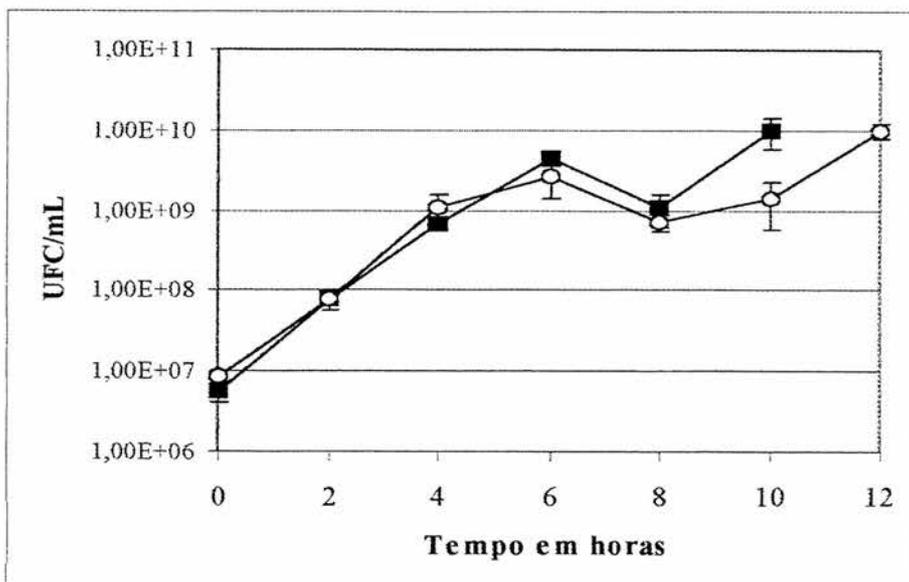


FIGURA 9: Curva de crescimento de *S. epidermidis* ATCC 25923 na ausência (■) e na presença (○) da Epidermina em UFC/mL. Cada ponto representa a média \pm desvio padrão de quatro determinações. Ponto 12 h sem Epidermina, UFC/mL > 1,0E+10.

Pode-se observar na FIGURA 10, os valores da Densidade ótica na curva de crescimento de *S. epidermidis* ATCC 25923 na presença e ausência de Epidermina, observa-se à redução dos valores de D.O. na curva em presença da bacteriocina, a partir das 8 horas.

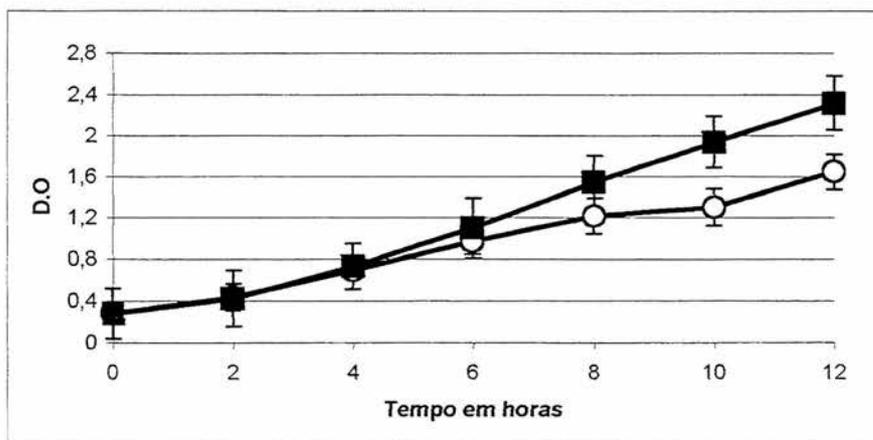


FIGURA 10: Curva de crescimento de *S. epidermidis* ATCC 25923 na ausência (■) e na presença (○) da Epidermina em D.O. Cada ponto representa a média \pm desvio padrão de quatro determinações.

4.5.5. Efeito de Epidermina durante o crescimento de *S. epidermidis* 634648

Para avaliar o efeito da Epidermina sobre o crescimento de *S. epidermidis* 634648, realizou-se uma curva de crescimento padrão de 12 horas. Com pontos em intervalos de 2 horas para a obtenção dos dados de Densidade Ótica e UFC/mL.

A FIGURA 11 ilustra os valores das UFC/mL, revelando curvas sobrepostas mas com diminuição no número de células viáveis em 10 e 12 horas.

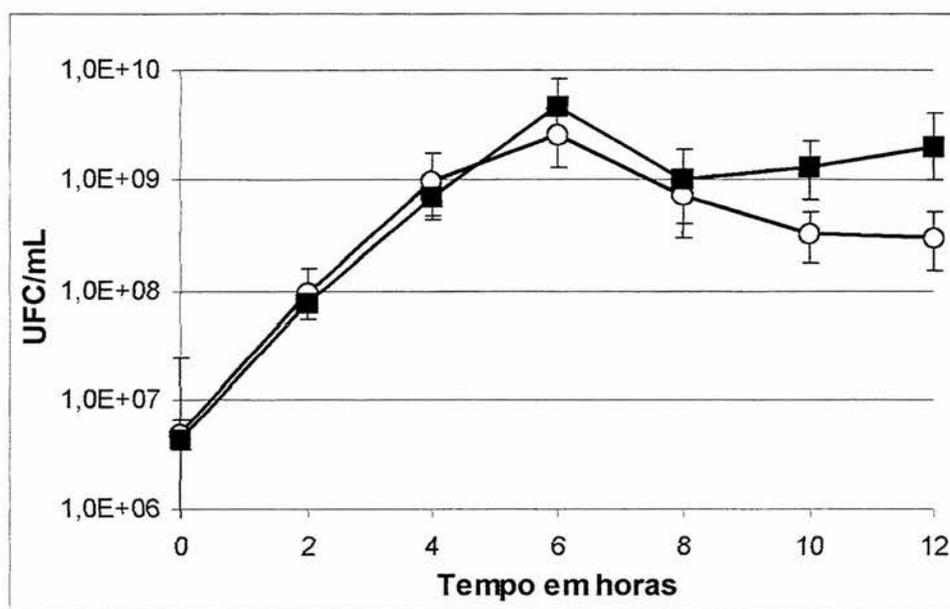


FIGURA 11: Curva de crescimento de *S. epidermidis* 634648 na ausência (■) e na presença (○) da Epidermina em UFC/mL. Cada ponto representa a média \pm desvio padrão de quatro determinações.

A FIGURA 12 ilustra os valores de densidade ótica obtidos durante a curva de crescimento, observa-se a diminuição a partir da oitava hora, sendo que o valor obtido na segunda hora maior que o valor obtido na curva sem bacteriocina.

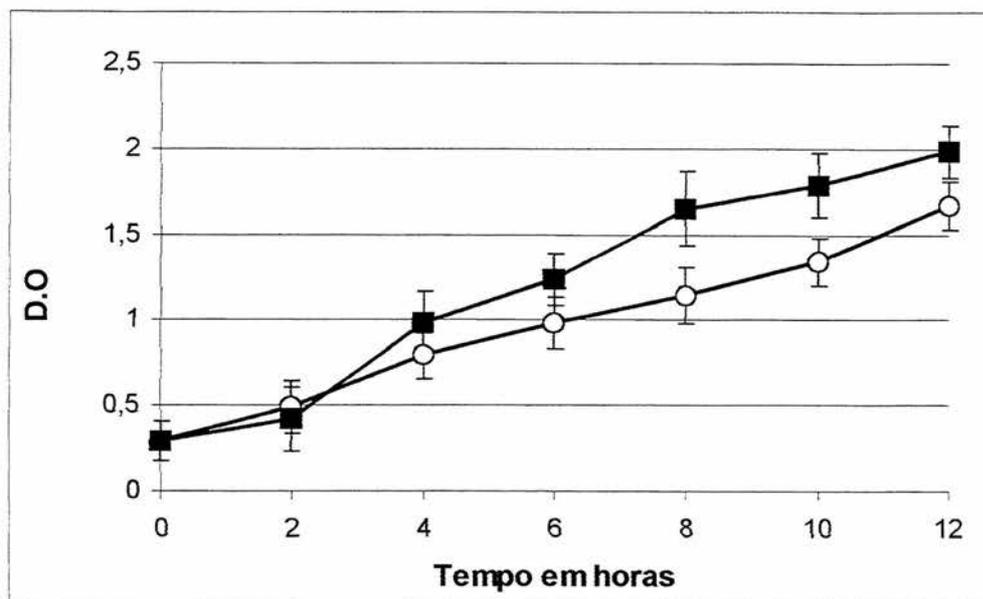


FIGURA 12: Curva de crescimento de *S. epidermidis* 634648 na ausência (■) e na presença (○) da Epidermina em D.O. Cada ponto representa a média \pm desvio padrão de quatro determinações.

4.5.6. Efeito de Epidermina durante o crescimento de *Corynebacterium* sp.

633544

Para avaliar o efeito da Epidermina sobre o crescimento de *Corynebacterium* 633544, realizou-se uma curva de crescimento padrão de 12 horas, com pontos em intervalos de 2 horas para a obtenção dos dados de Densidade Ótica e UFC/mL.

Pode-se observar na FIGURA 13, a diminuição dos valores de UFC/mL a partir das 10 horas de incubação.

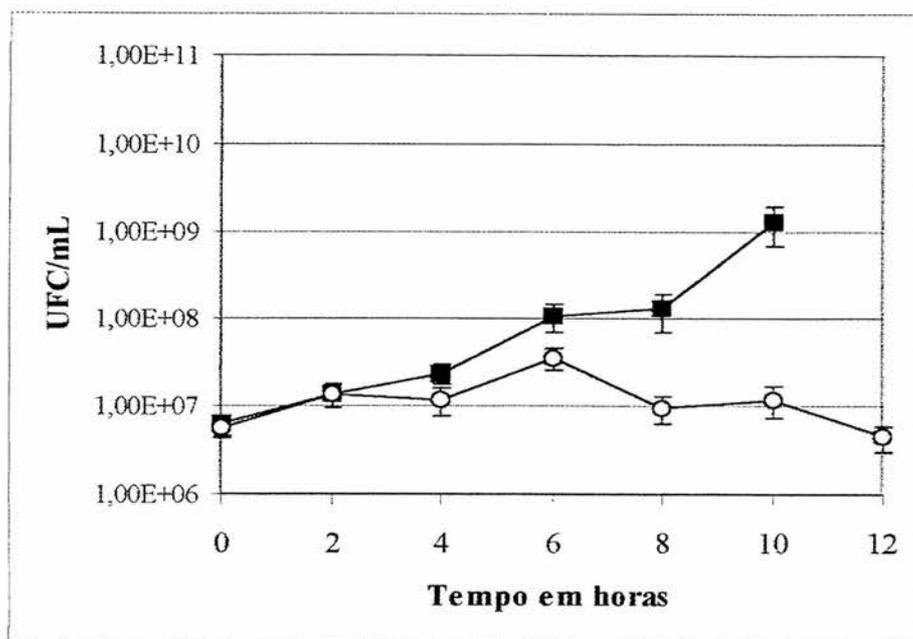


FIGURA 13: Curva de crescimento de *Corynebacterium* sp. 633544 na ausência (■) e na presença (○) da Epidermina em UFC/mL. Cada ponto representa a média \pm desvio padrão de quatro determinações. Ponto 12 h sem Epidermina, UFC/mL $> 1,0E+10$.

Na FIGURA 14, ilustram-se os resultados das curvas em valores de D.O. Pode-se observar que os valores de D.O. mantiveram-se constantes durante a incubação em presença da bacteriocina.

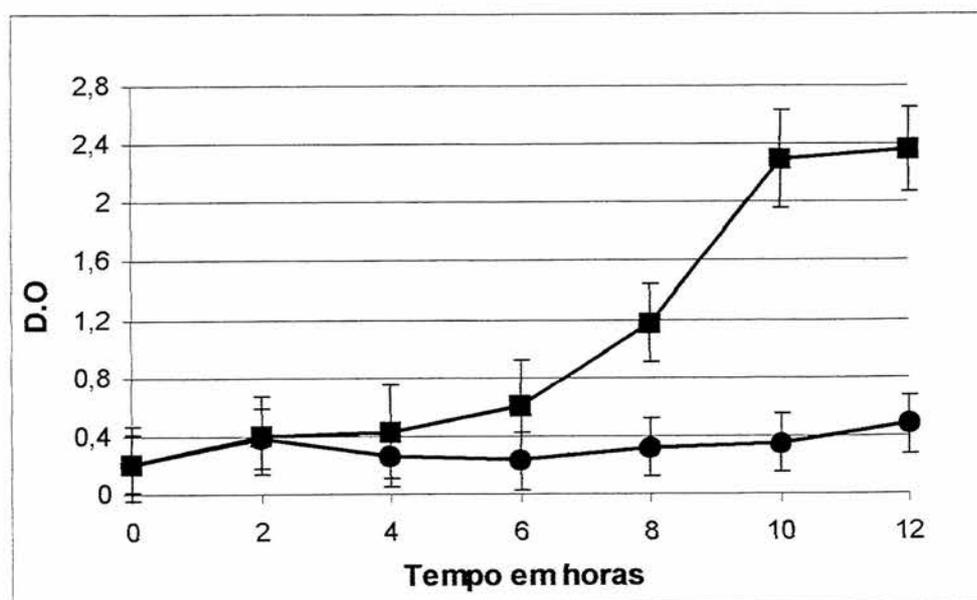


FIGURA 14: Curva de crescimento de *Corynebacterium* sp. 633544 na ausência (■) e na presença (●) da Epidermina em D.O. Cada ponto representa a média \pm desvio padrão de quatro determinações.

4.6 Teste *in vitro* da atividade das bacteriocinas em superfícies poliméricas

4.6.1. Efeito da Pep5 e Epidermina na aderência celular de *S. epidermidis* ATCC 25923.

As FIGURAS 15 e 16 ilustram o comportamento de aderência celular de *S. epidermidis* ATCC 25923 realizado pelos protocolos A, B e C frente a ação de PeP5, em UFC/mm² e D.O. Nos três protocolos, observou-se a diminuição do número de células viáveis e da Densidade Ótica, quando do tratamento com a bacteriocina, após 6 e 12 horas de incubação.

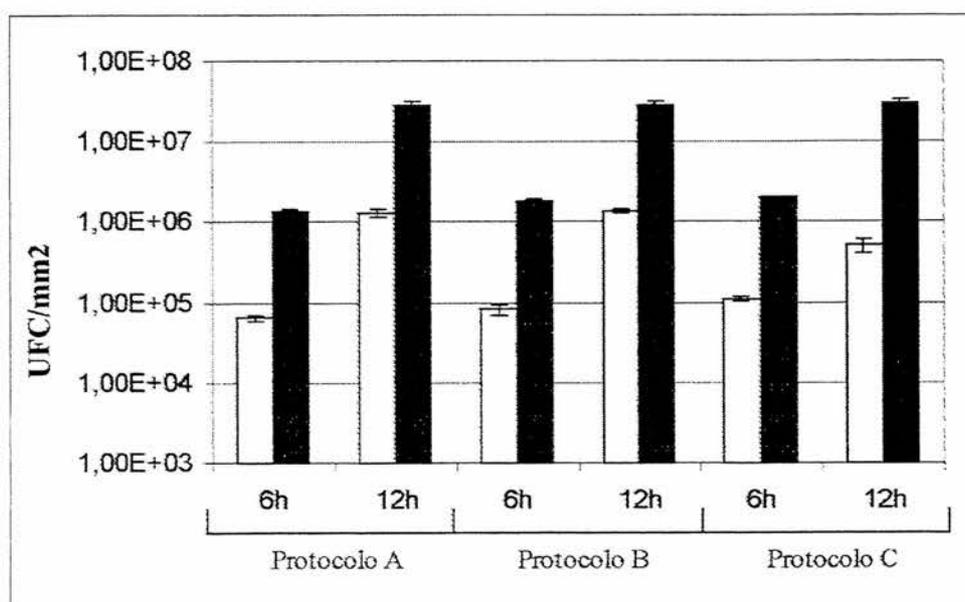


FIGURA 15: Efeito da PeP5 sobre *S. epidermidis* ATCC 25923 em UFC/mm². Os corpos de prova foram incubados na presença (□) ou ausência (■) de 640 UA/mL de PeP5, e o número de células viáveis foi determinado depois de 6 e 12 horas de incubação a 37°C. As barras representam a média ± desvio padrão de cinco determinações.

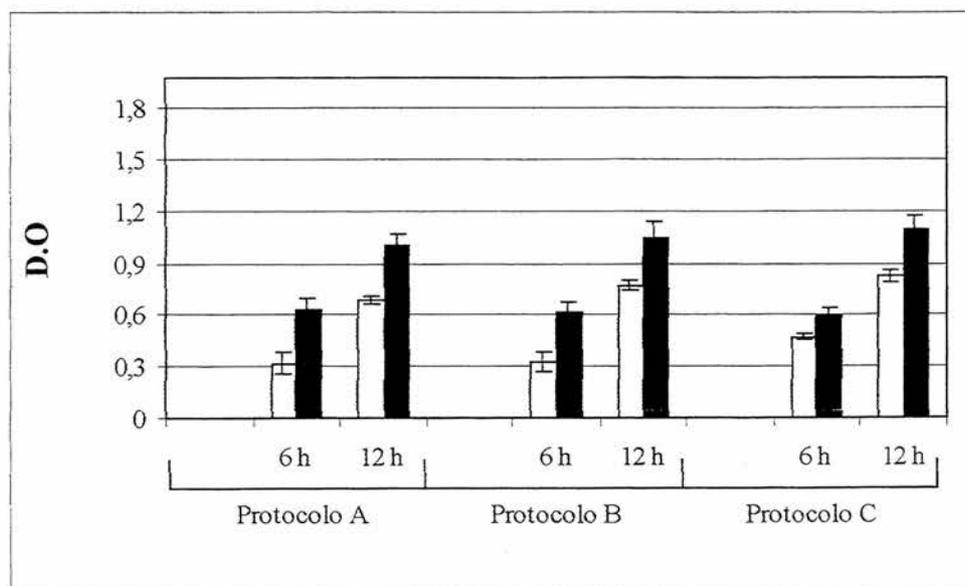


FIGURA 16: Efeito da PeP5 sobre *S. epidermidis* ATCC 25923 em D.O. Os corpos de prova foram incubados na presença (□) ou ausência (■) de 640 UA/mL de PeP5, a Densidade Ótica foi verificada depois de 6 e 12 horas de incubação a 37°C. As barras representam a média \pm desvio padrão de cinco determinações.

Verificou-se a redução do crescimento de *S. epidermidis* ATCC 25923, sendo que em todos os casos as diferenças entre 6 e 12 horas foram significativas quando os dados foram analisados estatisticamente pelo teste de Kruskal-Wallis.

As FIGURAS 17 e 18 ilustram o comportamento de aderência celular de *S. epidermidis* ATCC 25923, realizado pelos protocolos A, B e C, frente a ação de Epidermina, em UFC/mm² e D.O. Nos três protocolos, observou-se a diminuição do número de células viáveis e da Densidade Ótica, quando do tratamento com a bacteriocina, após 6 e 12 horas de incubação.

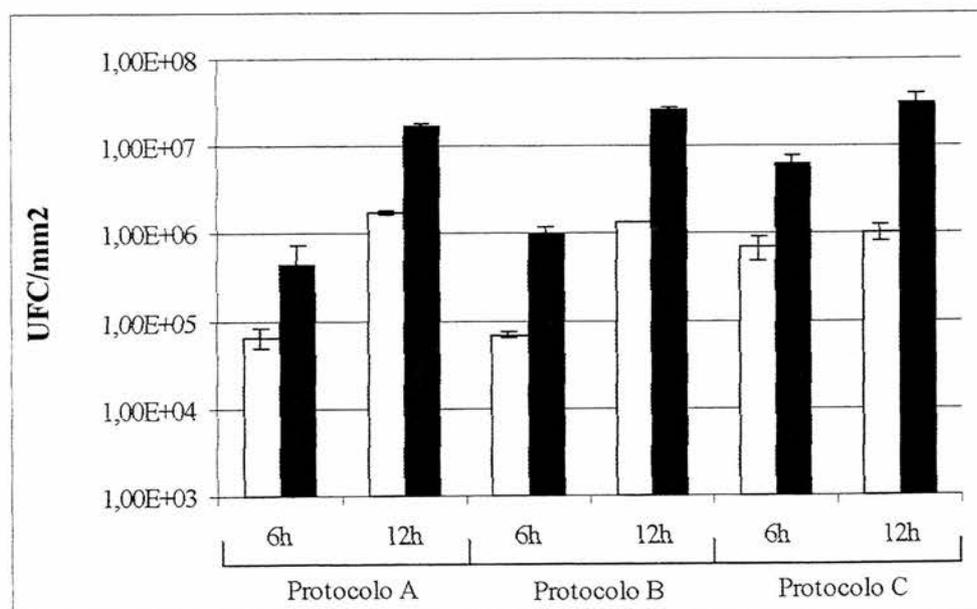


FIGURA 17: Efeito da Epidermina sobre *S. epidermidis* ATCC 25923 em UFC/mm². Os corpos de prova foram incubados na presença (□) ou ausência (■) de 640 UA/mL de Epidermina, e o número de células viáveis foi determinado depois de 6 e 12 horas de incubação a 37°C. As barras representam a média ± desvio padrão de cinco determinações.

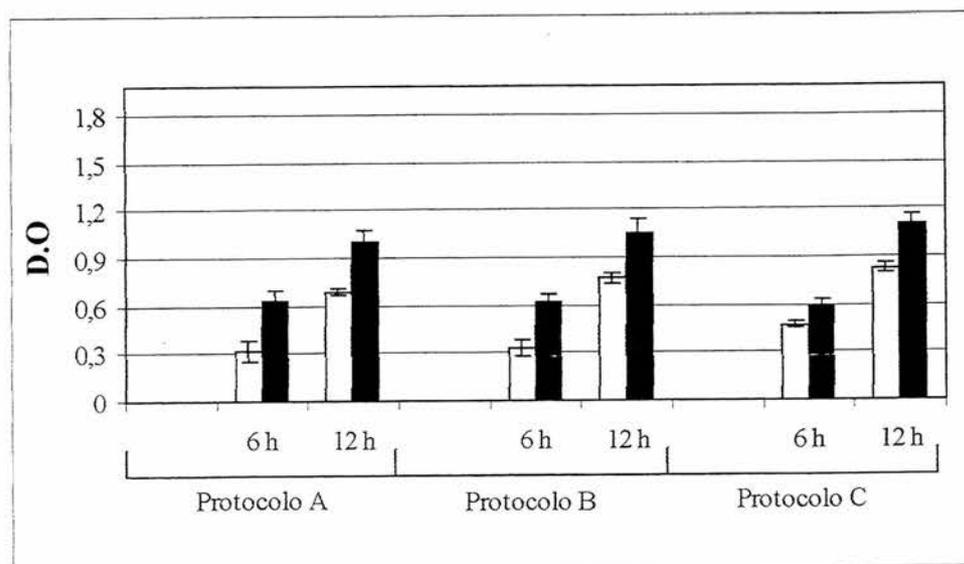


FIGURA 18: Efeito da Epidermina sobre *S. epidermidis* ATCC 25923 em D.O. Os corpos de prova foram incubados na presença (□) ou ausência (■) de 640 UA/mL de Epidermina, a Densidade Ótica foi verificada depois de 6 e 12 horas de incubação a 37°C. As barras representam a média ± desvio padrão de cinco determinações.

Verificou-se a redução do crescimento de *S.epidermidis* ATCC 25923, sendo que em todos os casos as diferenças entre 6 e 12 horas foram significativas quando os dados foram analisados estatisticamente pelo teste de Kruskal-Wallis.

4.6.2. Efeito da Pep5 e Epidermina na aderência celular de *S. epidermidis* 634648.

As FIGURAS 19 e 20 ilustram o comportamento de aderência celular de *S. epidermidis* 634648, realizado pelos protocolos A, B e C, frente a ação de PeP5, em UFC/mm² e D.O. Nos três protocolos, observou-se a diminuição do número de células viáveis e da densidade ótica, quando do tratamento com a bacteriocina, após 6 e 12 horas de incubação.

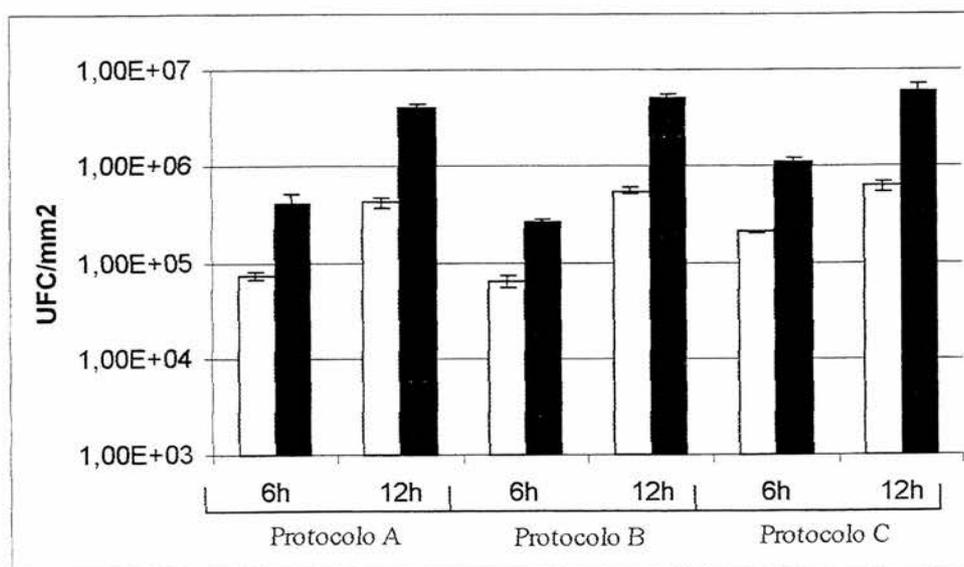


FIGURA 19: Efeito da PeP5 sobre *S.epidermidis* 634648 em UFC/mm². Os corpos de prova foram incubados na presença (□) ou ausência (■) de 640 UA/mL de PeP5, e o número de células viáveis foi determinado depois de 6 e 12 horas de incubação a 37°C. As barras representam a média ± desvio padrão de cinco determinações.

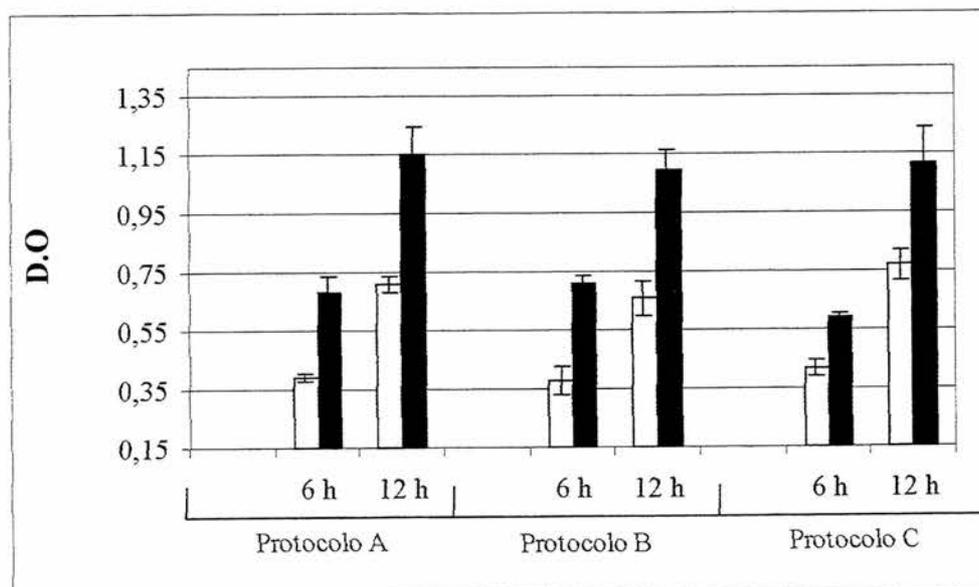


FIGURA 20: Efeito da PeP5 *S.epidermidis* 634648 em D.O. Os corpos de prova foram incubados na presença (□) ou ausência (■) de 640 UA/mL de PeP5, a Densidade Ótica foi verificada depois de 6 e 12 horas de incubação a 37°C. As barras representam a média \pm desvio padrão de cinco determinações.

Verificou-se a redução do crescimento de *S. epidermidis* 634648, sendo que em todos os casos as diferenças entre 6 e 12 horas foram significativas quando os dados foram analisados estatisticamente pelo teste de Kruskal-Wallis.

As FIGURAS 21 e 22 ilustram o comportamento de aderência celular de *S. epidermidis* 634648, realizado pelos protocolos A, B e C, frente a ação de Epidermina em UFC/mm² e D.O. Nos três protocolos, observou-se a diminuição do número de células viáveis e da Densidade Ótica, quando do tratamento com a bacteriocina, após 6 e 12 horas de incubação.

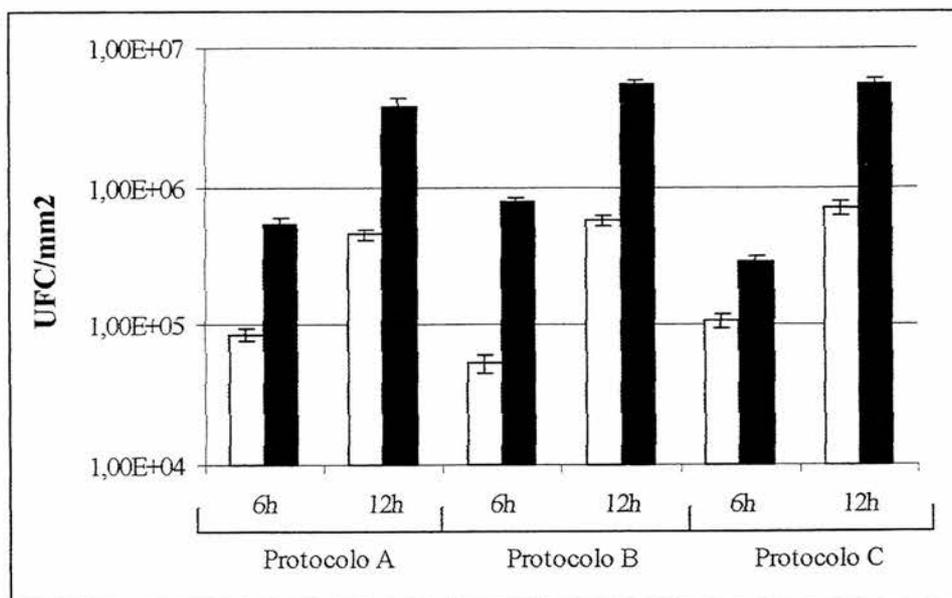


FIGURA 21: Efeito da Epidermina sobre *S. epidermidis* 634648 em UFC/mm². Os corpos de prova foram incubados na presença (□) ou ausência (■) de 640 UA/mL de Epidermina, e o número de células viáveis foi determinado depois de 6 e 12 horas de incubação a 37°C. As barras representam a média ± desvio padrão de cinco determinações.

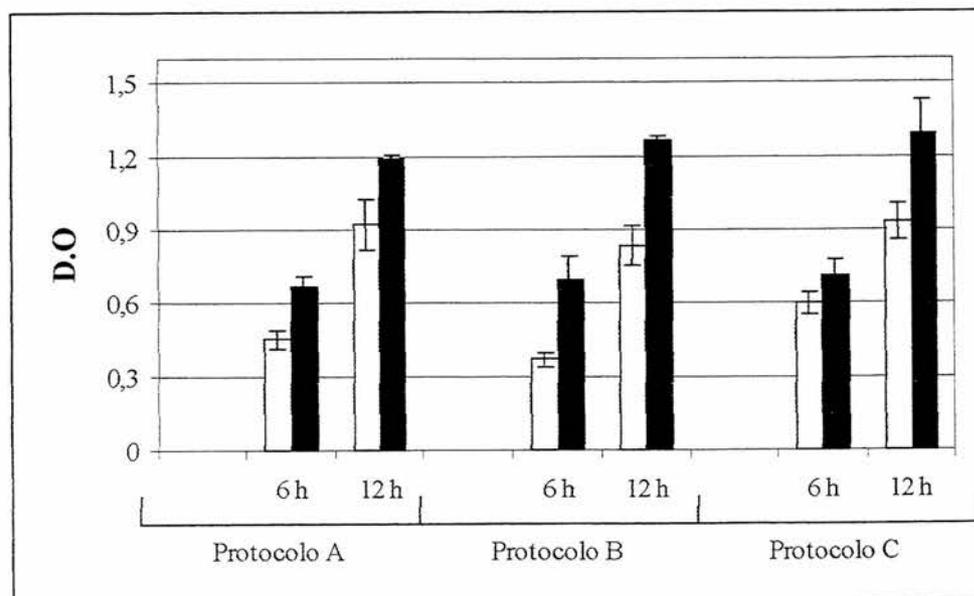


FIGURA 22: Efeito da Epidermina *S. epidermidis* 634648 em D.O. Os corpos de prova foram incubados na presença (□) ou ausência (■) de 640 UA/mL de Epidermina, a Densidade Ótica foi verificada depois de 6 e 12 horas de incubação a 37°C. As barras representam a média ± desvio padrão de cinco determinações.

Verificou-se a redução do crescimento de *S. epidermidis* ATCC 25923, sendo que em todos os casos as diferenças entre 6 e 12 horas foram significativas quando os dados foram analisados estatisticamente pelo teste de Kruskal-Wallis.

4.6.3. Efeito da Pep5 e Epidermina na aderência celular de *Corynebacterium* sp. 633544.

As FIGURAS 23 e 24 ilustram o comportamento de aderência de *Corynebacterium* sp. 633544, realizado pelos protocolos A, B e C, em UFC/mm² e D.O, frente a ação de PeP5. Nos três protocolos, observou-se a diminuição do número de células viáveis e da Densidade Ótica, quando do tratamento com a bacteriocina, após 6 e 12 horas de incubação.

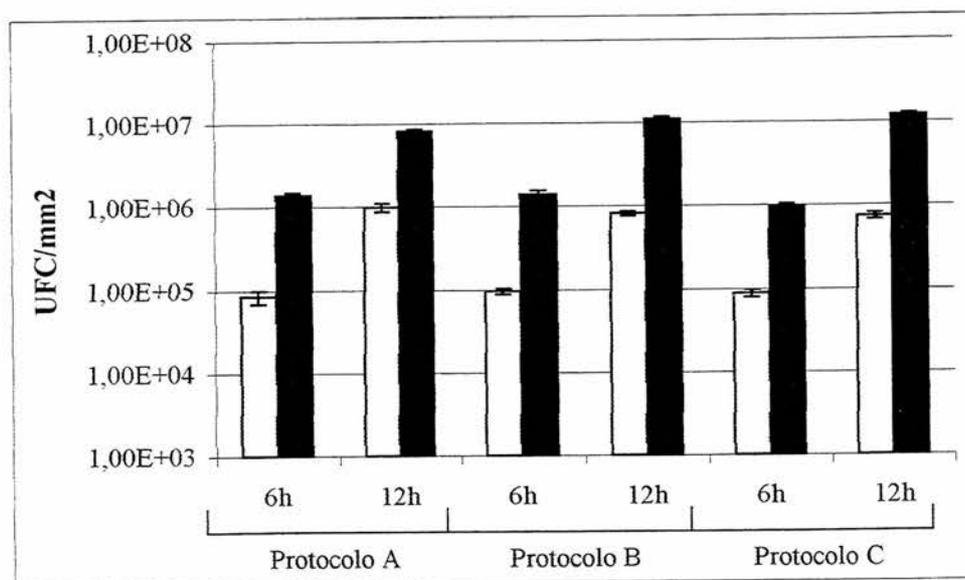


FIGURA 23: Efeito da PeP5 sobre *Corynebacterium* sp. 633544 em UFC/mL. Os corpos de prova foram incubados na presença (□) ou ausência (■) de 640 UA/mL de PeP5, e o número de células viáveis foi determinado depois de 6 e 12 horas de incubação a 37°C. As barras representam a média \pm desvio padrão de cinco determinações.

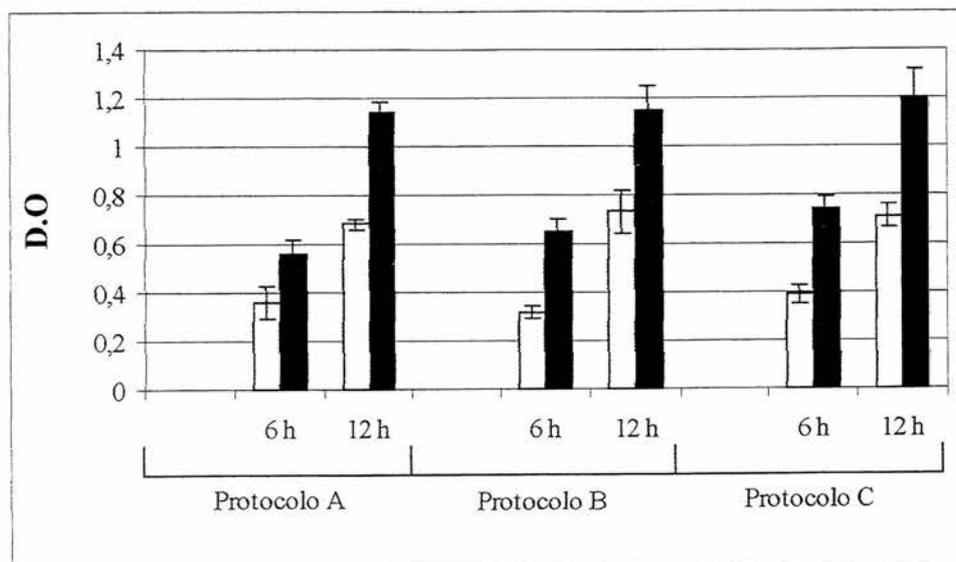


FIGURA 24: Efeito da PeP5 sobre *Corynebacterium* sp. em D.O. Os corpos de prova foram incubados na presença (□) ou ausência (■) de 640 UA/mL de PeP5, a Densidade Ótica foi verificada depois de 6 e 12 horas de incubação a 37°C. As barras representam a média \pm desvio padrão de cinco determinações.

Verificou-se a redução do crescimento de *S.epidermidis* ATCC 25929, sendo que em todos os casos as diferenças entre 6 e 12 horas foram significativas quando os dados foram analisados estatisticamente pelo teste de Kruskal-Wallis.

As FIGURAS 25 e 26 ilustram o comportamento de aderência celular de *Corynebacterium* sp. 633544, realizado pelos protocolos A, B e C, frente a ação de Epidermina, em UFC/mm² e D.O. Nos três protocolos, observou-se a diminuição do número de células viáveis e da Densidade Ótica, quando do tratamento com a bacteriocina, após 6 e 12 horas de incubação.

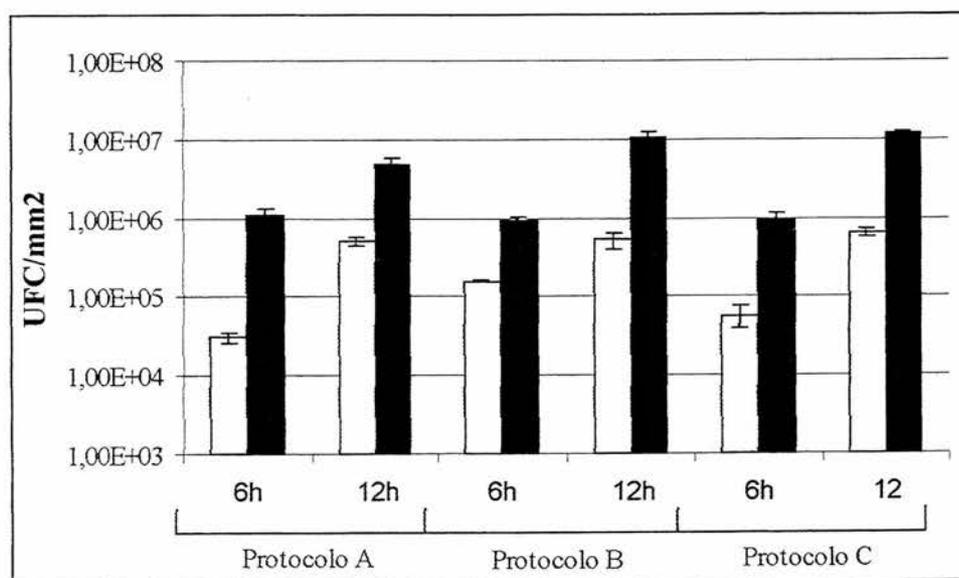


FIGURA 25: Efeito da Epidermina sobre *Corynebacterium* sp. 633544 em UFC/mL. Os corpos de prova foram incubados na presença (□) ou ausência (■) de 640 UA/mL de Epidermina, e o número de células viáveis foi determinado depois de 6 e 12 horas de incubação a 37°C. As barras representam a média \pm desvio padrão de cinco determinações.

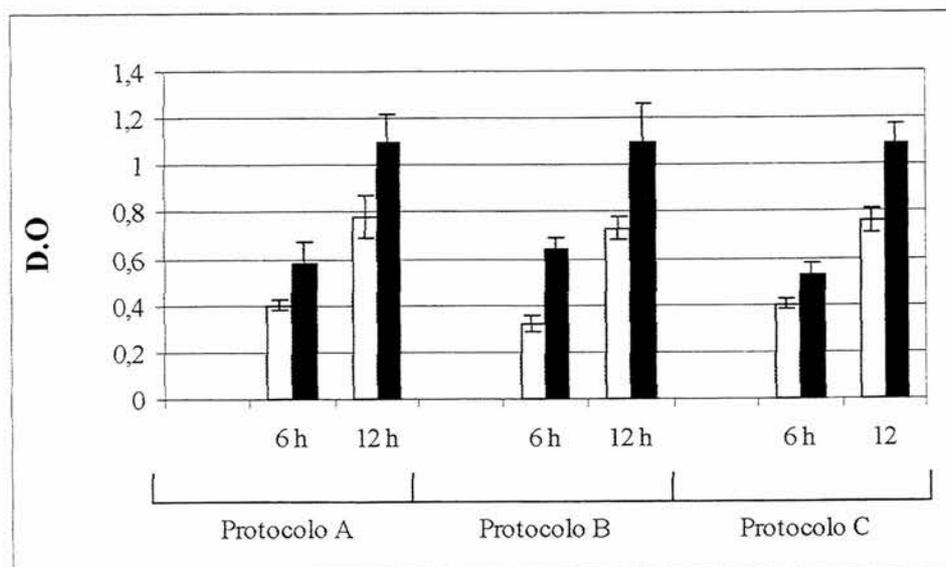


FIGURA 26: Efeito da Epidermina sobre *Corynebacterium* sp. 633544 em D.O. Os corpos de prova foram incubados na presença (□) ou ausência (■) de 640 UA/mL de Epidermina, a densidade ótica foi verificada depois de 6 e 12 horas de incubação a 37°C. As barras representam a média \pm desvio padrão de cinco determinações.

Verificou-se a redução do crescimento de *Corynebacterium* sp. 633544, sendo que em todos os casos as diferenças entre 6 e 12 horas foram significativas quando os dados analisados estatisticamente pelo teste de Kruskal-Wallis.

4.7. Microscopia Eletrônica

A FIGURA 27 ilustra a Microscopia Eletrônica de Varredura da estrutura do cateter sem tratamento inoculados com células de *Corynebacterium* sp. 633544 após 12 horas de incubação.

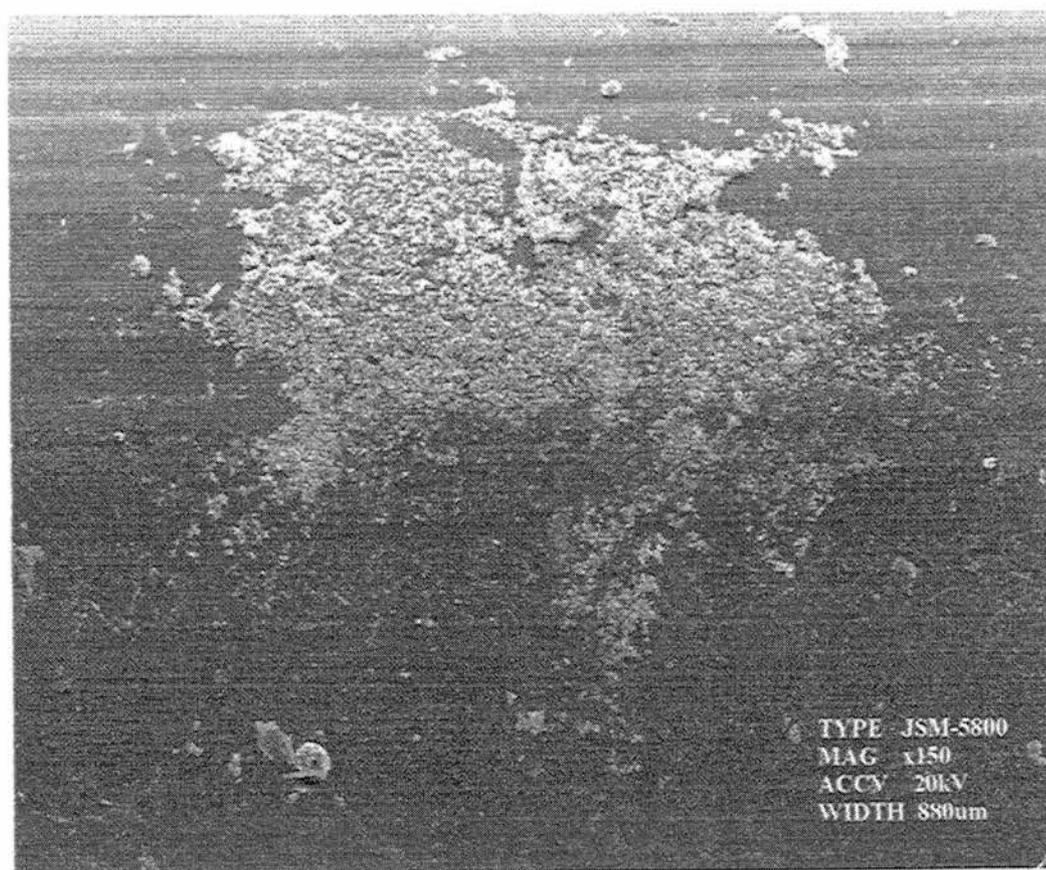


FIGURA 27: Microscopia Eletrônica de Varredura de aderência de *Corynebacterium* sp. 633544 na superfície externa de cateter de Vialon® após 12 horas de incubação.

Na FIGURA 27, pode-se observar a aderência das células ao longo da superfície polimérica, verificando-se uma maior aglomeração no centro.

A FIGURA 28, ilustra a Microscopia Eletrônica de Varredura das células de *Corynebacterium* sp. 633544, aderidas ao longo da superfície externa de cateter de Vialon® sem tratamento, após 12 horas de incubação.

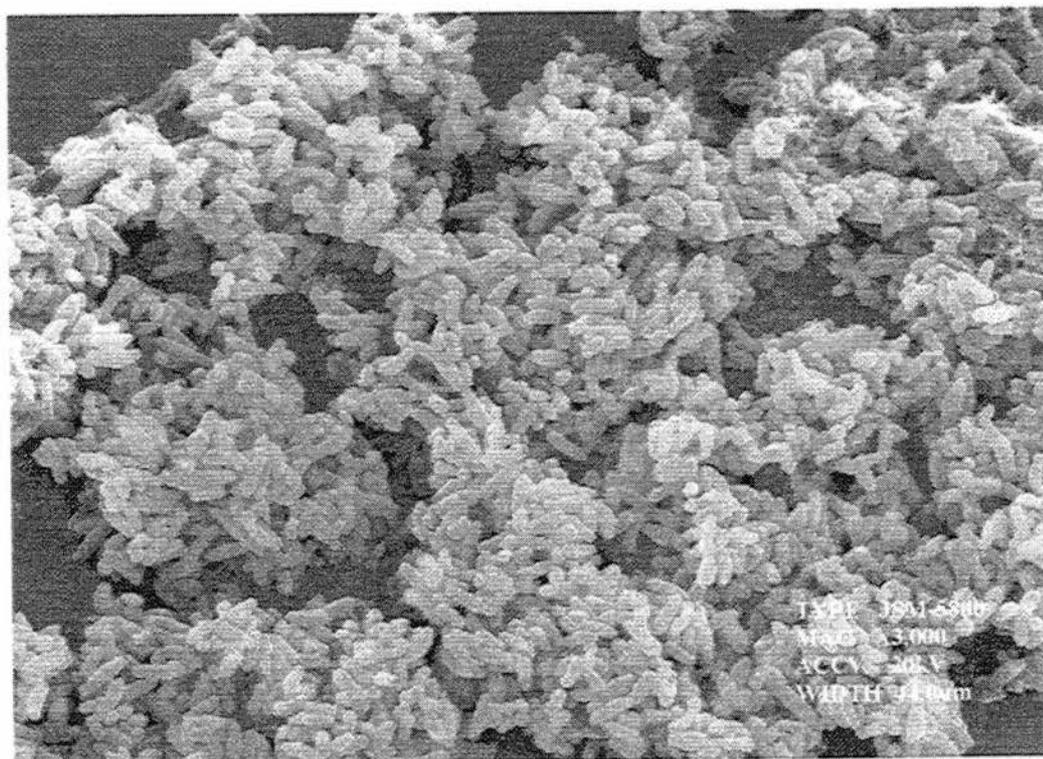


FIGURA 28: Microscopia Eletrônica de Varredura das células de *Corynebacterium* sp. 633544 na superfície externa de cateter de Vialon® após 12 horas de incubação.

A FIGURA 29, ilustra a Microscopia Eletrônica de Varredura do resultado do tratamento com a bacteriocina Pep5 sobre células de *Corynebacterium* sp. 633544, ao longo da superfície externa de cateter de Vialon®, realizado conforme o Protocolo A, após 12 horas de incubação.

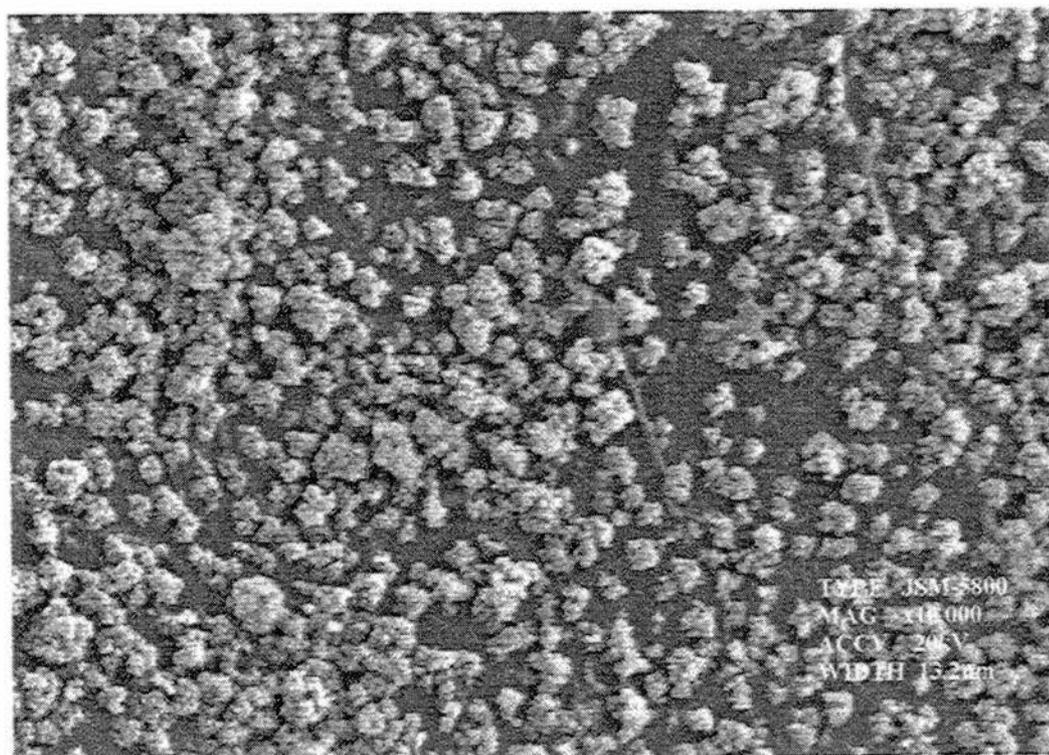


FIGURA 29: Microscopia Eletrônica de Varredura do efeito de Pep5 sobre *Corynebacterium* sp. 633544 na superfície externa de cateter de Vialon®, após com tratamento com a bacteriocina, após 12 horas de incubação.

Na FIGURA 29 pode-se observar a ação da bacteriocina na superfície do cateter, o qual apresenta-se tomado por resíduos de células de *Corynebacterium* sp. 63354 e em algumas regiões células intactas.

5. DISCUSSÃO

As bacteriocinas Pep5 e Epidermina causaram inibição *in vitro* de isolados clínicos de *S. epidermidis* e uma diminuição significativa da adesão de bacteriana à cateteres de silicone. Pep5 foi inibitória para a maioria dos isolados clínicos, sugerindo uma elevada efetividade como agente antimicrobiano contra este importante patógeno.

A diminuição observada no número de células viáveis de *S. epidermidis* e *Corynebacterium* sp. num período de 12 h com adição de bacteriocina indica que houve inibição do crescimento. Entretanto as leituras de D.O. indicaram que as células *S. epidermidis* e *Corynebacterium* sp. não foram lisadas. A Epidermina foi mais efetiva na inibição de *Corynebacterium* sp. 633544, observadas as curvas de crescimento em densidade óptica e UFC/mL, relacionado com o fato desse microrganismo ter apresentado um halo inibitório de 36mm quando testado contra tal bacteriocina. O efeito de bacteriocinas sobre o crescimento bacteriano pode ser dependente das condições do ensaio, da quantidade e grau de purificação da bacteriocina, do meio de cultivo, da linhagem indicadora e sua concentração. Estudos com diferentes bacteriocinas demonstram que embora se observe um efeito bacteriostático com doses baixas, pode-se alcançar um efeito bacteriolítico com o aumento da concentração da bacteriocina (BOUCABEILLE et al., 1997; MOTTA & BRANDELLI, 2002).

Infecções associadas com o uso de caterer venoso central podem resultar em complicações médicas importantes e dispendiosas (PITTET et al., 1994). Estudos recentes tem demonstrado que o uso de cateter venoso central impregnado com antibióticos está associado com a diminuição das taxas de colonização de cateteres e de

infecções da corrente sanguínea comparado com o uso de cateteres não impregnados (MAKI et al., 1997). Embora o efeito de Pep5 e Epidermina tenha sido apenas observado sobre a adesão *in vitro* de *S. epidermidis* e *Corynebacterium* sp. à cateteres, a redução significativa do número de células aderidas ao substrato estimula futuros estudos. Considerando a aderência microbiana como um passo essencial no fator de patogenicidade de microrganismos, a inibição desta é importante para a prevenção de infecções nosocomiais (DANKERT et al., 1986).

Estudos relacionados com alterações na estrutura do material, que constitui os cateteres, são de grande valia. Materiais antiadesivos ou resistentes à colonização *in vivo* por microrganismos patogênicos seriam as opções mais convenientes para evitar infecções associadas à dispositivos intravasculares.

Não parecendo possível produzir um material absolutamente antiadesivo, que retenha suas propriedades regulares na mais complexa situação *in vivo*, há algumas evidências que propriedades intrínsecas do material sejam vantajosas, concernente a resistência à infecção. Estes são: 1. superfícies que são revestidas com albumina ou preferencialmente albumina adsorvida; 2. hidroflicidade e; 3. materiais antitrombogênicos.

Vários grupos tentaram desenvolver polímeros com novas propriedades de superfícies levando à redução de adesão inicial dos patógenos. Bridgett et al. (1992) estudaram a adesão de três isolados de *Staphylococcus epidermidis* em superfícies de poliestireno, que foram modificados com um copolímero de poli (óxido de etileno) e poli (óxido de propileno). *In vitro*, houve redução substancial da adesão bacteriana quando utilizadas tais substâncias. Resultados semelhantes foram encontrados por Desai

et al. (1992), investigando a adesão de *Staphylococcus epidermidis*, *S. aureus* e *Pseudomonas aeruginosa* a polímeros modificados com poli (óxido de etileno).

Polímeros com substâncias antimicrobianas, com um propósito terapêutico de prevenção a adesão microbiana, têm uma longa tradição (MARCINKO, 1995). O princípio de tais artificios é a ligação superficial ao cateter de uma substância antimicrobiana (um antibiótico, desinfetante ou metal) diretamente ou incorporada ao material.

Darouiche et al. (1999) conduziram um estudo impregnando a superfície de cateteres com minociclina e rifampina, observando a redução da colonização de microrganismos neste.

Poucos estudos relacionam a atividade de bacteriocinas com adesão a superfícies ou formação de biofilmes. A bacteriocina produzida por *Lactococcus lactis* CNZR150 foi capaz de inibir a formação de biofilme por *Listeria monocytogenes*. Esta propriedade foi associada a produção de bactericina pois perdeu-se com tratamento com proteases e não foi observado em mutante *L. lactis* nisina-negativo (LERICHE et al., 1999). As células plantônicas foram muito mais sensíveis a nisina que as aderidas, pois uma vez aderidas a superfícies as bactérias se tornam mais resistentes a ambientes adversos. A adesão bacteriana foi significativamente inibida em cateteres tratados com nisina. Três bactérias clinicamente relevantes (*S. aureus*, *S. epidermidis*, and *Streptococcus faecalis*) foram testadas e em todos casos poucas células foram capazes de aderir as superfícies ou aquelas que aderiram foram subsequentemente mortas (BOWER et al., 1998).

As bacteriocinas estudadas, PeP5 e Epidermina, causaram uma redução na aderência de isolados clínicos em superfícies de cateteres, quando testados *in vitro*, com *S. epidermidis* ATCC 25923, *S. epidermidis* 634648 e *Corynebacterium* sp. 633544,

sugerindo uma alta eficácia das substâncias testadas. As bacteriocinas escolhidas pertencem ao grupo dos lantibióticos, que são peptídeos antibióticos contendo um aminoácido raro com ligação tioéter lantionina e/ou metilantionina (KUIPERS et al., 1996). Os resultados similares obtidos com PeP5 e Epidermina podem estar relacionados com a similaridade das características e, com o modo de ação destas bacteriocinas.

Estas bacteriocinas são reconhecidas por inibirem isolados de estafilococos, particularmente *S. epidermidis* e *S. aureus*. *Staphylococcus epidermidis* é um habitante natural da pele humana e de mucosas das membranas, não sendo considerado um patógeno para o hospedeiro. Porém as infecções relacionadas a esse microrganismo são consideradas como um tipo de infecção nosocomial iatrogênica especial, por possuírem uma variedade de propriedades de virulência e por possuírem a habilidade de aderirem-se e acumularem-se nas superfícies de polímeros (por exemplo: cateteres), e produzirem substância extracelular, desencadeando infecção nosocomial (CHRISTENSEN et al., 1983; VUONG & OTTO, 2002).

Pode-se constatar visualmente a ação da Pep5 frente a *Corynebacterium* sp. 633544, através das fotografias de Microscopia Eletrônica de Varredura. Observaram-se regiões com resíduos celulares e regiões com células intactas, sugerindo que a bacteriocina não se distribuiu homoganeamente na superfície do cateter.

Os três protocolos demonstraram resultados similares, não evidenciando assim diferenças nos tratamentos dos corpos de prova. A pré-sensibilização destes no Protocolo B não se mostrou a mais atrativa, como poderia ser esperado, sugerindo que a presença da substância antimicrobiana é mais relevante do que o método. Apesar de não serem observadas diferenças significativas neste trabalho, o protocolo de impregnação

pode ser importante, principalmente no sentido de considerar impregnação interna e externa. Estudos com antibióticos impregnados apenas na superfície externa apresentam menor efetividade (RAAD *et al.* 1997). A diferença poderia ser importante devido ao papel da colonização luminal, causando infecção da corrente sanguínea relacionada a cateter. O uso de sonicação para recuperar as células aderidas de ambas superfícies interna e externa justifica-se pois fornece dados mais precisos que outras técnicas (SHERERTZ *et al.*, 1990).

Embora a resistência microbiana seja uma consideração de relevância, vários autores tem encontrado uma baixa possibilidade de que a resistência a antibióticos resulte do uso de cateteres impregnados com antibióticos (RAAD *et al.*, 1995; RAAD *et al.*, 1997). Outra preocupação estaria relacionanda com uma resposta imune adversa. A bacteriocina nisina, um lantibiótico como Pep5 e Epidermina, é capaz de modular o sistema imunológico de camundongos através de aumento de linfócitos-T CD4 e CD8 e fundamentalmente por aumento da população de macrófagos isolados da circulação periférica (DE PABLO *et al.*, 1999). Além de serem necessários estudos específicos neste sentido, é necessário considerar a relação risco-benefício da utilização do antimicrobiano. O antibiótico glicopeptídico vancomicina, por exemplo, está associado com uma série de efeitos adversos imunologicamente mediados (RATNAIKE & JONES, 1998; SMITH & TAYLOR, 1999).

6. CONCLUSÕES

Pode-se concluir dos resultados obtidos neste trabalho:

- As bacteriocinas Pep5 e Epidermina inibiram eficientemente bactérias isoladas de cateteres. Entre as bacteriocinas testadas pelo método de antagonismo direto, a PeP5 inibiu um maior número de isolados testados.

- Entre os isolados clínicos testados, a maior sensibilidade observada foi de *Corynebacterium* sp. 633544 frente a ação da Epidermina.

- As bacteriocinas PeP5 e Epidermina demonstraram atividade inibitória quando testadas durante o crescimento das bactérias indicadoras *S. epidermidis* ATCC 25923, *S. epidermidis* 634648 e *Corynebacterium* sp. 633544.

- As bacteriocinas Pep5 e Epidermina causaram diminuição na aderência celular das linhagens *S. epidermidis* ATCC 25923, *S. epidermidis* 634648 e *Corynebacterium* sp. 633544 em cateteres de silicone.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARNOW, P.M.; QUIMOSING, E.M.; BEACH, M. Consequences of intravascular catheter infection. **Clinical Infectious Diseases**, Chicago, v. 16, p. 778-784, 1993.

BAND, J.D.; MAKI, D.G. Steel needles used for intravenous therapy: morbidity in patients with hematologic malignancy. **Archives of Internal Medicine**, Chicago, v. 140, p. 31-34, 1980.

BANNERJEE, S.N. et al. Secular trends in nosocomial primary bloodstream infections in the United States, 1980 – 1989. **The American Journal of Medicine**, New York, v. 9, p. 87S-89S, 1991. (Supl. 3B).

BECK-SAGUÉ, C.M. et al. Epidemic bacteremia due to *Acinetobacter baumannii* in five intensive care units. **American Journal of Epidemiology**, Baltimore, v. 132, p. 723-733, 1990.

BECK-SAGUÉ, C.M.; JARVIS, R. National nosocomial infections surveillance system: secular trends in the epidemiology of nosocomial fungal infections in the United States, 1980-1990. **Journal of Infectious Diseases**, Chicago, v. 167, p. 1247- 1251, 1999.

BIERBAUM, G. et al. The biosynthesis of the lanthibiotics epidermin, gallidermin, PeP5 and epilancin K7: review. **Antonie van Leeuwenhoek**, Amsterdam, v. 69, n. 2, p. 119-127, 1996.

BIERBAUM, G. et al. Engineering of a novel thioether bridge and role of modified residues in the lanthibiotics PeP5. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 62, n. 2, p. 385-392, 1996.

BOUZA, E. et al. *Serratia* bacteremia. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, New York, v. 7, p. 237-247, 1987.

BOUCABEILLE C., et al. Antibacterial and hemolytic activities of linescin OC2, a hydrophobic substance produced by *Brevibacterium linens* OC2. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v.153, p.295-301, 1997.

BOWER, C.K.; DAESCHEL, M.; MCGUIRE, J. Protein antimicrobial barriers to bacterial adhesion. **Journal Dairy Science**, Champaign, Ill., US, v. 81, p. 2771-2778, 1998.

BRAUNSTEIN, H. Rapid diagnosis of intravascular catheter-associated infection by Gram staining of catheter segments. **New England Journal of Medicine**, Waltham, Mass., US, v. 313, p. 754-755, 1985.

BRIDGETT M.J.; DAVIS M.C.; DENEYER, S.P. Control of *staphylococcal* adhesion to polystyrene surfaces by polymer surface modification with surfactants. **Biomaterials**, Surrey, UK, v. 13, p. 411-416, 1992.

BRYAN, C.S.; REYNOLDS, K.L.; BRENNER, E.R. Analysis of 1.186 episodes of gram-negative bacteremia in non-university hospitals: the effects of antimicrobial therapy. **Reviews of Infectious Diseases**, Chicago, v. 5, p. 629-638, 1983.

BUCHHOLZ, D.H. et al. Bacterial proliferation in platelet products stored at room temperature: transfusion-induced *Enterobactre* sepsis. **New England Journal of Medicine**, Waltham, Mass., US, v. 85, p. 429-433, 1971.

CENTER FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). Guideline for prevention of nosocomial pneumonia. **MMWR: Morbidity and Mortality Weekly Report**, Atlanta, GA, US, v. 46, p. 297-299, 1997.

CHOW, J.W. et al. *Enterobacter* bacteremia: clinical features and emergence of antibiotic resistance during therapy. **Annals of Internal Medicine**, Philadelphia, v.115, p.585- 590, 1991.

CHRISTENSEN, G.D. et al. Characterization of clinically significant strains of coagulase negative staphylococci. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v.18, p.258, 1983.

CLERI, D.L.; CORRADO, M.L.; SELIGMAN, S.J. Quantitative culture of intravenous catheters and other intravascular inserts. **Journal of Infectious Diseases**, Chicago, v. 141, p. 781-786, 1980.

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

COSTERTON, J.W. et al. Biofilms, the customizes microniche. **Journal of Bacteriology**, Washington. v. 176, p. 2137-2142, 1994.

COSTERTON, J.W. et al. Microbial biofilms. **Annual Reviews of Microbiology**, Palo Alto, v. 49, p. 711- 745, 1995.

COTTONARO, C.N. et al. Quantitation and characterization of comparative protein binding to polymers. **Transactions American Society for Artificial Internal Organs**, Chicago, v. 27, p. 391-395, 1981.

DANKERT, J.; HOST, A.H., FEIJEN, J. Biomedical polymers: bacterial adhesion, colonization and infection. **Critical Reviews in Biocompatibility**, Boca Raton, v. 2, n. 3, p. 219-301,1986

DAROUICHE, R.O. et al. A comparison of two antimicrobial-impregnated central venous catheters: catheter study group. **New England Journal of Medicine**, Waltham, Mass., US, v. 340, p. 1-8, 1999.

DAVENPORT, D.S. et al. Usefulness of a test for slime production as a marker for clinically significant infections with coagulase – negative staphylococci. **Journal of Infectious Diseases**, Chicago, v. 153, p. 332, 1986.

DE PABLO, M.A. et al. Evaluation of immunomodulatory effects of nisin-containing diets on mice. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, Amsterdam, v.24, p.35-42, 1999.

DE VUYST, L.D.; VANDAMME, E.J. Influence of the carbon source on nisin production in *lactococcus lactis* subsp. *lactis* bath fermentations. **Journal General of Microbiology**, London, v. 138, p. 571-578, 1992.

DE VUYST, L.D.; VANDAMME, E.J. Microbial manipulation of nisin biosynthesis and fermentation. In: JUNG, G.; SAHL, H.G. (Ed.). **Nisin and novel lantibiotics**. Leiden: ESCOM Science, 1991. p. 397-409.

DE VUYST, L.D.; VANDAMME, E.J. Nisin, a lantibiotic produced by *Lactococcus lactis* subsp *lactis*: properties, biosynthesis fermentation and application. In: De VUYST L.D.; VANDAMME, E.J. (Ed). **Bacteriocins of lactic bacteria: microbiology, genetics and applications**. London: Blackie Academic & Professional, 1994. p. 151-122.

DESAI, N.P.; HOSSAINY, S.F.; HUBBELL, J.A.. Surface-immobilized polyethylene oxide for bacterial repellence. **Biomaterials**, Surrey, UK, v. 13, p. 417-420, 1992.

DONOWITZ, L.G. Nosocomial infection in neonatal intensive care units. **American Journal of Infection Control**, Saint Louis, Mo., US, v. 17, p. 250-257, 1989.

FERREIRA, V.L.P. et al. **Análise sensorial**. Campinas: SBCTA, 2000. 127p. (Manual: Série Qualidade).

FLETCHER, M. The physiological activit of bacteria attachment to solid surfaces. **Advances in Microbial Physiology**, London, v. 32, p. 53-58, 1991.

GALLAGHER, P.G. *Enterobacter* bacteremia in pediatric patients. **Reviews of Infectious Diseases**, Chicago, v. 12, p. 808-812, 1990.

GARCÍA DE LA TORRE, M. et al. *Klebsiella* bacteremia: an analysis of 100 epipsodes. **Reviews of Infectious Diseases**, Chicago, v. 7, p. 143-150, 1985.

GARRISON, R.N.; WILSON, M.A. Intravenous and central catheter infections. **Surgical Clinics of North American**, New York, v. 74, p. 557-570, 1994.

GAYNES, R.P.; MARTONE, W.J.; CULVER, D.H. et. al. Comparison of rates of nosocomial infection in neonatal intensive care units in the United States. **The American Journal of Medicine**, New York, v. 91, p. 192S-196S, 1991. (Supl. 3B).

GENIGEORGIS, C. Biofilm: their significance to cleaning in the meat sector. In: BURT, S.A.; BAUER, F. (Ed.). **New challenges in meat hygiene: specific problems in cleaning and disinfection**. Utrecht, Netherlands: Ecceamst, European Consortium for Continuing Education in Advanced Meat Science and Technology 1995. p. 29-47.

GIAMBIAGI-DE-MARVAL, M. et al. Distinct groups of plasmids correlated with bacteriocin in *Staphylococcus aureus*. **Journal of General Microbiology**, London, v. 136, p. 1591-1599, 1990.

GOLDMANN, D.A.; DURBIN, W.A.; FREEMAN, J. Nosocomial infections in a neonatal intensive care unit. **Journal of Infectious Diseases**, Chicago, v. 144, p. 449-459, 1981.

GOLDMANN, D.A.; DURBIN, W.A.; FREEMAN, J. Nosocomial infections and death in a neonatal intensive care unit. **Journal of Infectious Diseases**, Chicago, v. 147, p. 641-653, 1983.

GRANSDEN, W.R. et al. Bacteremia due to *Escherichia coli*: a study of 861 episodes. **Reviews of Infectious Diseases**, Chicago, v. 12, p. 1008-1018, 1990.

GROEGER, J.S. et al. Infectious morbidity associated with long-term use of venous access devices in patients with cancer. **Annals of Internal Medicine**, Philadelphia, v. 119, p. 1168-1174, 1993.

HAMORY, B.H. Nosocomial bloodstream and intravascular device-related infections: In: WENZEL, R.P. (Ed.). **Prevention and control of nosocomial infections**. Baltimore: Williams and Wilkins, 1987. p. 283-319.

HEMMING, V.G.; OVERALL, J.C.; BRITT, M.R. Nosocomial Infections in a newborn intensive care unit. Results of forty-one months of surveillance. **New England Journal of Medicine**, Waltham, Mass., US, v. 294, p. 1310-1316, 1976.

HERRMANN, M. et al. Thrombospondin binds to *Staphylococcus aureus* and promotes staphylococcal adherence to surfaces. **Infection and Immunity**, Washington, v. 59, p. 279-288, 1991.

HOAR, P.F. et al. Heparin bonding reduces thrombogenicity of pulmonary artery catheters. **New England Journal of Medicine**, Waltham, Mass., US, v. 305, p. 993-995, 1981.

JACK, R.W.; JUNG, G. Lantibiotics and microcins: polypeptides with unusual chemical diversity. **Current Opinion in Chemical Biology**, Washington, v. 4, p. 310-317, 2000.

JANSEN, B. Vascular catheter-related infection: an etiology and prevention. **Current Opinion in Chemical Biology**, Washington, v. 6, p. 526-531, 1993.

JANSEN, B.; KOHNEM, W. Prevention of biofilm formation by polymer modification. **Journal Industrial Microbiology**, New York, v. 15, p. 391-396, 1995.

JAVIS, W.R. et al. Nosocomial infection in adult and pediatric intensive care units in the United States: national nosocomial Infections surveillance system. **The American Journal of Medicine**, New York, v. 91, p. 185S-191S, 1991. (Supl. 3B)

JAVIS, W.R.; MARTONE, W.J. Predominant pathogens in hospital infections. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, Oxford, UK, v. 29, p. 19-24, 1992. (Supl A).

JERNIGNAN, J.A.; FARR, B.M. Short-course therapy of catheter-related *Staphylococcus aureus* bacteremia: a meta-analysis. **Annals of Internal Medicine**, Philadelphia, v. 119, p. 304-311, 1993.

JIMÉNEZ – DIAZ, R. et al. Plantaricin S and T, two news bacteriocins produced by *Lactobacillus plantarium* LPCO 10 isolated from a green olive fermentation. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington , v. 59, p. 1416-1424, 1993.

JOHANSEN, C.; FALHOLT, P.G. Enzymatic removal and disinfection of bacterial biofilms. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 9, p. 3724-3728, 1997.

KIMURA, H. et al. Novel bacteriocin of *Pediococcus* spp. ISK-1 isolated from well-aged bed of fermented rice bran. **Annals New York Academy of Sciences**, New York, v. 864, p. 345-348, 1998.

KOHNEM, W.; RUITEN, D.; JANSEN, B. Correlation between free energy for adhesion and bacterial adhesion to polymers- the minimum adherence hypothesis. In: MEETING OF AMERICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY, 93., 1994., Las Vegas. [Abstracts]. Washington: ASM, 1994. Abstract 1.35.

KUIPERS O.P. et al. Protein engineering of lantibiotics: review. **Antonie van Leeuwenhoek**, Amsterdam, v. 69, n.2, p. 161-169, 1996.

LERICHE, V.; CHASSAING, D.; CARPENTIER, B. Behavior of *L. monocitogenes* in an artificially made biofilm of a niin-producing strain of *Lactococcus lactis*. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 15, n. 2-3, p. 169-182, 1999.

LINARES, J. et al. Pathogenesis of catheter sepsis: a prospective study with quantitative and semiquantitative cultures of catheter hub and segments. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 21, p. 357-360, 1985.

MAC FADDIN, J.P.; LIPPINCOTT, P. **Biochemical testes for identification of medical bacteria**. Baltimore: Williams and Wilkins, 2000. 912p.

MCLEAN, R.J. et al. Antibacterial activity of multilayer silver-copper surface films on catheter material. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 39, p. 895-899, 1993.

MACK, D.; SIEMSEN, N.; LAUFS, R. Parallel induction by glucose of adherence and a polysaccharide antigen specific for plastic- adherent *Staphylococcus epidermidis*. **Infection and Immunity**, Washington, v. 64, p. 277-282, 1996a.

MACK, D. et al. The intracellular adhesion involved in biofilm accumulation of *Staphylococcus epidermidis* is a linear β -1,6-linked glukosamino-glycan: purification and structural analysis. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 17, p. 175-183, 1996b.

MAKI, D.G. Nosocomial bacteremia: a epidemiologic overview. **The American Journal of Medicine**, New York, v. 70, p. 719-732, 1981.

MAKI, D.G. Pathogenesis, prevention, and management of infections due to intravascular devices used for infusion therapy. In: BISNO, A.L.; WALDVOGEL, F.A. (Ed.). **Infections associated with indwelling medical devices**. 2nd ed. Washington: American Society for Microbiology, 1994. p. 155-212.

MAKI, D.G.; STOLZ, S. The epidemiology of central-venous catheter-related bloodstream infection (BSI). In: INTERSCIENCE CONFERENCE OF ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY, 34., 1994, Orlando. **Programs and abstracts**. Washington: ASM, 1994. Abstract 547.

MAKI, D.G.; WEISE, C.E.; SARAFIN, H.W. A semi-quantitative culture method for identifying intravenous-catheter-related infection. **New England Journal of Medicine**, Waltham, Mass., US, v. 296, p. 1302-1309, 1977.

MAKI, D.G. et al. A prospective, randomized trial of gauze and two polyurethane dressings for site care of pulmonary artery catheters: implications for catheter management. **Critical Care Medicine**, Des Plaines, IL, US, v. 22, p. 1729-1737, 1994.

MAKI, D.G. et al. Prevention of central venous catheter-related bloodstream infection by use of an antiseptic-impregnated catheter: a randomized, controlled trial. **Annals of Internal Medicine**, New York, v.127, p.257-266, 1997.

MARCHALL, K.C. Biofilms: an overview of bacterial adhesion, activity, and control of surfaces. **American Medical News**, Chicago, v. 58, p. 202- 207, 1992.

MARCINKO, D.E. Gentamicin-impregnated PPMA beads: an introduction and review. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 24, p. 116-121, 1995.

MERMEL, L.A.; MAKI, D.G. Infections complications of Swan-ganz pulmonary artery catheters. Pathogenesis, epidemiology, prevention, and management. **American Journal of Respiratory Critical Care Medicine**, New York, v. 149, p. 1020- 1036, 1994.

MICHELE, L.; PEARSON, M.D. **Guideline for prevention of intravascular device related infections**. Atlanta: The Hospital Infection Control Practices Advisory Committee., 1995. paginação irregular.

MILLER, P.J.; WENZEL, R.P. Etiologic organisms as independent predictors of death and morbidity associated with bloodstream infections. **Journal of Infectious Diseases**, Chicago, v. 56, p. 471- 477, 1987.

MOTTA, A.S.; BRANDELLI, A. Characterization of an antimicrobial peptide produced by *Brevibacterium lineus*. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, UK, v. 92, p. 63-70, 2002.

NASCIMENTO, J.D. et al. Phenotypic and genetic characterisation of bacteriocin-producing strains of *Staphylococcus aureus* involved in bovine mastitis. **Veterinary Microbiology**, New York, v.85, p.133-144, 2002.

NES, I.F.D.; HAVARSTEIN, L.S.; HOLO, H. Genetics of non-lantibiotics bacteriocins. In: FERRETI , J.J. et al. (Ed). **Genetics of streptococci, enterococci and lactococci**. New York: Karger, 1995. p. 645-651.

NIVENS, D.E.; PALMER, R.; WHITE, D.C. Continuous nondestructive monitoring of microbial biofilms: a review of analytical techniques. **Journal Industrial Microbiology**, New York, v. 15, p. 263- 276, 1995.

PFALLER, M.A.; HERWALDI, L.A. Laboratory, clinical, and epidemiological aspects of coagulase-negative staphylococci. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v. 1, p. 281, 1988.

PIARD, J.C.; DESMAZEAUD, M. Inhibiting factors produced by lactic acid bacteria. bacteriocins and other antibacterial substance. **Lait**, Paris, v. 72, p. 113-142, 1992.

PITTET, D. Nosocomial bloodstream infections. In: WENZEL, R.P. (Ed.). **Prevention and control of nosocomial infections**. Baltimore: Williams and Wilkins, 1993. p. 512-555.

PITTET, D., TARARA, D., WENZEL, R.P. Nosocomial bloodstream infection in critically ill patients: excess length of stay, extra costs, and attributable mortality. **Journal of the American Medical Association**, Washington, v.271, p.1598-1601, 1994.

POLLACK, M. *Pseudomonas aeruginosa*. In: MANDELL, G.L.; BENETT, J.; DOLIN, R. (Ed.). **Principles and practice of infectious diseases**. 4th ed. New York: Churchill Livingstone, 1995. p. 1980-2003.

POWELL, N.M. et al. Interactions between pairs of bacteriocins from lactic bacteria. **Journal of Food Protection**, Ames, v. 61, n. 9, p. 1210-1212, 1998.

RAAD, H. et al. Prevention of central venous catheter-related infections by using maximal sterile barrier precautions during insertion. **Infection Control and Hospital Epidemiology**, Thorofare, NJ, US, v. 15, p. 231-238, 1994.

RAAD, I. et al. Antibiotics and prevention of microbial colonization of catheters. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Washington, v.39, p.2397-2400, 1995.

RAAD, I. et al. Central venous catheters coated with minocycline and rifampin for the prevention of catheter-related colonization and bloodstream infections: a randomized, double blind trial. **Annals of Internal Medicine**, New York, v.127, p.267-274, 1997.

RATNAIKE, R.N., JONES, T.E. Mechanisms of drug-induced diarrhoea in the elderly. **Drugs & Aging**, New York, v.13, p.245-253, 1998.

REUBEN, A.G. et al. Polymicrobial bacteremia: clinical and microbiologic patterns. **Reviews of Infectious Diseases**, Chicago, v. 11, p. 161-183, 1989.

RICHTMANN, R. Infecções da corrente sanguínea e relacionada a dispositivos intravascular. In: RODRIGUES, E.A.C. et al. (Ed.). **Infecções hospitalares prevenção e controle**. São Paulo: Sarvier, 1997. p. 191-202.

ROBERTS, F.J.; GEERE, I.W.; COLDMAN, A. A three-year study of positive blood cultures, with emphasis on prognosis. **Reviews of Infectious Diseases**, Chicago, v. 13, p. 34-46, 1991.

RUPP, M.E.; ARCHER, G.L. Coagulase-negative *Staphylococcus*: pathogens associated with medical progress. **Clinical Infectious Diseases**, Chicago, v. 19, p. 231-245, 1994.

SANGALI, S.; BRANDELLI, A. Feather keratin hidrolisis by a *Vibrio* sp. strain Kr2. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, UK, v. 89, p. 735-743, 2000.

SEIFERT, H.; STRATE, A.; PULVERER, G. Nosocomial bacteremia due to *Acinetobacter baumannii*: clinical features, epidemiology, and predictors of mortality. **Medicine**, Baltimore, v. 74, p. 340-349, 1995.

SHERERTZ, R.J. et al. Contribution of vascular catheter material to the pathogenesis of infection: the enhanced risk of silicone *in vivo*. **Journal Biomedical Materials Research**, New York, v. 29, p. 635-645, 1995.

SHERERTZ, R.J. et al. Three-year experience with sonicated vascular catheter cultures in a clinical microbiology laboratory. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 28, p. 76-82, 1990.

SIEGMAN-IGRA, Y. et al. Nosocomial *Acinetobacter* meningitis secondary to invasive procedures: report of 25 cases and review. **Clinical Infectious Diseases**, Chicago, v. 17, p 843-849, 1993.

SIOSHANSI, P. New processes for surface treatment of catheters. **Artificial Organs**, Cleveland, Ohio, US, v. 18, p. 266-272, 1994.

SMITH, P.F., TAYLOR, C.T. Vancomycin-induced neutropenia associated with fever: similarities between two immune-mediated drug reactions. **Pharmacotherapy**, Amsterdam, v.19, p.240-244, 1999.

SOLOVSKJ, M.V.; ULBRICH, K.; KOPECEK, J. Synthesis of N-(2-hydroxypropyl) methacrylamide copolymers with antimicrobial activity. **Biomaterials**, Surrey, UK, v. 4, p. 44-48, 1993.

TAGG, J.R.; DAJANI, A.S.; WANNAMARKER, L.W. Bacteriocins of gram- positive bacteria. **Bacteriology Reviews**, Baltimore, MS, US, v.40, p.722-756, 1976.

VAN DE VEEN, F.J.M.; JUNG, G. Structure of lantibiotics studied by NMR. **Antonie van Leeuwenhoek**, Amsterdam, v.69, p.99-107, 1996.

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

WALDVOGEL, F.A. *Staphylococcus aureus*. In: MANDELL, G.L.; BENNETT, J.E.; DOLIN, R. (Ed.). **Principles and practices of infections diseases**. 4th ed. New York: Churchill Livingstone, 1995. p. 1754-1777.

WATNICK, P.; KOLTER, R. Biofilms, a city of microbes. **Journal of Bacteriology**, Washington, v.182, n.10, p.2675-2679, 2000.

WATTS, J.L.; NAIDU, A.S.; WADSTRÖ, M.T. Collagen binding, elastase production, and slime production associated with coagulase-negative *Staphylococcus* isolated from bovine intramammary infections. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 45, p. 768-774, 1990.

WEINSTEIN, M.P.; RELLER, L.B.; MURPHY, J.R. Clinical importance of polymicrobial bacteremia. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, New York, v. 5, p. 185-196, 1986.

WELCH, A.G. Antibiotics in acrylic bone cement. **Journal Biomedical Materials Research**, New York, v. 12, p. 679, 1978.

WIDMER, A.F. IV-related infections. In: WENZEL, R.P.B. (Ed.). **Prevention and control of nosocomial infections**. Baltimore: Williams and Wilkins, 1993. p.556- 579.

APÊNDICE I – MEIOS UTILIZADOS

Meios utilizadosMEIO DE CITRATO DE SIMMONS:

Sulfato de Magnésio	0,2g
Fosfato Dihidrogenado de Amônio	1,0g
Fosfato Dipotássio	1,0g
Citrato de Sódio	2,0g
Cloreto de Sódio	5,0g
Ágar-ágar	15 a 20g
Azul de Bromotimol	0,08g
Água destilada	1.000mL

FERMENTAÇÃO/OXIDAÇÃO:

Peptona	2,0g
Cloreto de Sódio	5,0g
Hidróxido de potássio	1,5g
Ágar-ágar	3,0g
Água destilada	1,000mL
Azul de bromotimol, solução aquosa a 0,2%	15,0mL

MEIO GELATINA NUTRIENTE:

Extrato de Carne	3,0g
Peptona	5,0g
Gelatina	120,0g
Água destilada	1,000mL

INDOL:

Água Peptonada	1,000mL
Cloreto de Sódio	5,0g
Peptona	10 a 20g

MOTILIDADE:

Extrato de Carne	3,0g
Peptona	10,0g
Cloreto de Sódio	5,0g
Ágar-ágar	4,0g
Água destilada	1,000mL

REDUÇÃO DE NITRATOS:Meio Caldo nitrato

Extrato de Carne	3,0g
Peptona	5,0g
Nitrato de Potássio	1,0g
Água destilada	1,000mL

REATIVOS:Solução A

Alfa naftilamina	5,0g
Ácido Acético, 5N 30%	1,000mL
Ácido Acético Glacial	30mL
Água destilada, <i>qsp</i>	1,000mL

Solução B

Ácido sulfanílico	8g
Ácido acético 5N	1,000mL

OXIDASE REATIVOS:Reagentes A

Alfa-naftol a 1% em etanol 95%

Reagente B

p-aminodimetilanilina HCl (1%)	1,0g
Alfa-naftol	1,0g
Álcool etílico 95%	100mL

Reagente C

Tetrametil-p-fenilenediamine a 1%

APÊNDICE II – ANÁLISE ESTATÍSTICA

Fig 3: Valores, Médias, Desvios Padrão, Valor de H e p-valor das Curvas de Crescimento de *S. epidermidis* ATCC 25923 na presença e ausência de PeP5 em UFC/ml

Com PeP5	Inóculo	Ponto 1	Ponto 2	Ponto 3	Ponto 4	Ponto 5	Ponto 6
Média	6,60E+06	4,40E+07	1,10E+08	2,60E+08	4,50E+08	5,60E+08	2,20E+09
N1	7,00E+06	3,80E+07	1,40E+08	2,60E+08	2,40E+08	3,80E+08	2,10E+09
N2	5,70E+06	4,10E+07	2,00E+07	1,80E+08	3,90E+08	4,60E+08	3,40E+09
N3	5,40E+06	3,80E+07	1,50E+08	2,40E+08	4,80E+08	5,90E+08	1,90E+09
N4	8,30E+06	5,90E+07	1,30E+08	3,60E+08	6,90E+08	8,10E+08	1,40E+09
DP	1,33E+06	1,01E+07	6,06E+07	7,48E+07	1,88E+08	1,88E+08	8,52E+08
Sem PeP5							
Médias	Inóculo	Ponto 1	Ponto 2	Ponto 3	Ponto 4	Ponto 5	Ponto 6
N1	6,70E+06	5,10E+07	4,10E+08	1,10E+09	4,90E+09	>10e+10	>10E+10
N2	5,10E+06	5,60E+07	4,60E+08	1,40E+09	4,80E+09		
N3	7,30E+06	6,00E+07	5,50E+08	1,20E+09	2,70E+09		
N4	5,90E+06	5,80E+07	3,80E+08	6,00E+08	4,40E+09		
DP	8,50E+06	3,00E+07	2,50E+08	1,20E+09	7,70E+09		
valor H	1,51E+06	1,41E+07	1,27E+08	3,46E+08	2,08E+09		
p-valor	0,3373	5,3333	5,3333	5,3333	5,3333		
	0,5614	0,0209	0,0209	0,0209			

Fig 4: Valores, Médias e Desvios Padrão, Valor de H e p-valor das Curvas de Crescimento de *S. epidermidis* ATCC 25923 na presença e ausência de PeP5 em D.O

Com PeP5	Inóculo	Ponto 1	Ponto 2	Ponto 3	Ponto 4	Ponto 5	Ponto 6
Médias	0,289	0,49	0,98	1,278	1,49	2,01	2,2
N1	0,189	0,52	1,05	1,3	1,41	2,03	2,3
N2	0,27	0,47	1,03	1,27	1,6	2,1	2,1
N3	0,3	0,6	0,93	1,1	1,5	2	2,21
N4	0,4	0,37	0,91	1,44	1,45	1,91	2,19
DP	0,087179413	0,096263527	0,070237692	0,139612559	0,082056891	0,078740079	0,082056891
Sem PeP5							
Médias	Inóculo	Ponto 1	Ponto 2	Ponto 3	Ponto 4	Ponto 5	Ponto 6
N1	0,289	0,473	1,345	1,649	1,83	2,4	2,38
N2	0,27	0,52	1,35	1,65	1,88	2,5	2,4
N3	0,27	0,39	1,21	1,66	1,89	2,37	2,5
N4	0,3	0,46	1,29	1,64	1,9	2,39	2,31
DP	0,024494897	0,06236452	0,127017059	0,082056891	0,120277457	0,069761498	0,090553851
valor H	0,0211	5,3333	5,3333	5,3976	5,3333	5,3333	5,3976
p-valor	0,8845	0,0209	0,0209	0,0202	0,0209	0,0209	0,0202

Fig 5: Valores, Médias e Desvios Padrão, valores de H e p-valor das Curvas de Crescimento de *S. epidermidis* 634648 na presença e ausência de PeP5 em UFC/mL

Com PeP5	Inóculo	Ponto 1	Ponto 2	Ponto 3	Ponto 4	Ponto 5	Ponto 6
Médias	5,50E+06	4,20E+07	9,70E+07	2,60E+08	5,00E+08	3,20E+08	3,00E+08
N1	5,90E+06	2,10E+07	1,30E+08	2,30E+08	3,70E+08	2,90E+08	2,90E+08
N2	4,90E+06	3,90E+07	6,70E+07	2,70E+08	5,30E+08	2,20E+08	3,10E+08
N3	7,10E+06	4,50E+07	9,60E+07	3,40E+08	3,90E+08	3,70E+08	4,10E+08
N4	4,10E+06	6,30E+07	9,50E+07	2,00E+08	7,10E+08	4,00E+08	1,90E+08
DP	1,30E+06	1,73E+07	2,58E+07	6,06E+07	1,57E+08	8,12E+07	9,02E+07
Sem PeP5							
Médias	4,90E+06	3,40E+07	6,80E+08	1,50E+09	2,30E+09	6,30E+09	Ponto 6 >10E+10
N1	4,20E+06	3,40E+07	6,70E+08	9,00E+08	2,40E+09	6,70E+09	
N2	3,80E+06	3,00E+07	6,10E+08	1,60E+09	3,60E+09	5,60E+09	
N3	4,40E+06	2,80E+07	4,70E+08	2,40E+09	2,10E+09	4,20E+09	
N4	7,20E+06	4,40E+07	9,70E+08	1,10E+09	1,10E+09	8,70E+09	
DP	1,55E+06	7,12E+06	2,11E+08	6,68E+08	1,03E+09	1,90E+09	
valor H	0,7500	5,3333	5,3333	5,3333	5,3333	5,3333	
p-valor	0,3865	0,0209	0,0209	0,0209	0,0209	0,0209	

Fig 6: Valores, Médias e Desvios Padrão, Valores de H e p-valor das Curvas de Crescimento de *S. epidermidis* 634648 na presença e ausência de PeP5 em D.O

Com PeP5	Inóculo	Ponto 1	Ponto 2	Ponto 3	Ponto 4	Ponto 5	Ponto 6
Médias	0,26	0,448	0,807	1,32	1,345	1,96	2,03
N1	0,24	0,32	0,75	1,3	1,35	1,94	2,1
N2	0,28	0,42	0,82	1,2	1,3	1,8	2,2
N3	0,23	0,32	0,94	1,4	1,26	1,95	1,91
N4	0,29	0,73	0,718	1,38	1,47	2,15	1,91
DP	0,029439203	0,194143418	0,098366661	0,090921211	0,091104336	0,14399074	0,144452991
Sem PeP5							
Médias	0,26	0,412	1,47	1,79	1,98	2,44	2,49
N1	0,24	0,41	1,5	1,69	1,9	2,5	2,4
N2	0,19	0,31	1,25	1,74	2,01	2,33	2,46
N3	0,22	0,4	1,42	1,8	1,9	2,4	2,47
N4	0,39	0,52	1,71	1,93	2,11	2,53	2,63
DP	0,089069261	0,086023253	0,190962474	0,103601802	0,100995049	0,092014492	0,098319208
valor H	0,0843	5,3333	5,3333	5,3333	5,3976	5,3333	5,3976
p-valor	0,7715	0,0209	0,0209	0,0209	0,0202	0,0209	0,0202

Fig 7: Valores, Médias e Desvios Padrão, Valores de H e p-valor das Curvas de *Corynebacterium sp.* 633544 na presença e ausência de PeP5 em UFC/mL

Com PeP5	Inóculo	Ponto 1	Ponto 2	Ponto 3	Ponto 4	Ponto 5	Ponto 6
Média	3,9E+06	3,00E+07	1,10E+07	2,80E+07	2,30E+07	1,40E+08	1,90E+08
N1	3,1E+06	3,80E+07	1,40E+07	2,20E+07	2,40E+07	2,70E+08	1,30E+08
N2	3,3E+06	3,80E+07	7,00E+06	3,50E+07	2,00E+07	2,20E+08	1,40E+08
N3	4,3E+06	2,10E+07	1,20E+07	2,40E+07	3,20E+07	3,40E+08	2,40E+08
N4	4,9E+06	2,30E+07	1,20E+07	3,10E+07	1,60E+07	2,70E+08	2,50E+08
DP	8,49E+05	9,27E+06	2,99E+06	6,06E+06	6,83E+06	4,93E+07	6,38E+07
Sem PeP5	Inóculo	Ponto 1	Ponto 2	Ponto 3	Ponto 4	Ponto 5	Ponto 6
Médias	5,9E+06	1,50E+07	3,50E+07	1,10E+08	1,10E+08	1,10E+09	>10E+10
N1	4,9E+06	2,20E+07	3,70E+07	1,20E+08	4,00E+07	1,10E+09	
N2	5,7E+06	3,00E+07	2,60E+07	1,50E+08	1,50E+08	1,30E+09	
N3	6,0E+06	2,70E+07	2,80E+07	1,20E+08	1,30E+08	5,00E+08	
N4	7,00E+06	1,90E+07	4,90E+07	5,00E+07	1,20E+08	1,60E+09	
DP	8,68E+05	4,93E+06	1,05E+07	4,24E+07	4,83E+07	4,65E+08	
valor H		0,7590	5,3333	5,3333	5,3333	5,3976	
p-valor		0,3836	0,0202	0,0202	0,0209	0,0202	

Fig 8: Valores, Médias e Desvios Padrão, valores de H e p-valor das Curvas de Crescimento de *Corynebacterium sp.* 633544 na presença e ausência de PeP5 em D.O

Com PeP5	Inóculo	Ponto 1	Ponto 2	Ponto 3	Ponto 4	Ponto 5	Ponto 6
Médias	0,21	0,38	0,3	0,27	0,39	0,38	0,52
N1	0,24	0,35	0,21	0,19	0,33	0,3	0,7
N2	0,29	0,41	0,39	0,26	0,34	0,36	0,43
N3	0,11	0,5	0,23	0,32	0,41	0,32	0,46
N4	0,2	0,38	0,37	0,31	0,48	0,54	0,49
DP	0,076157731	0,064807407	0,093094934	0,059441848	0,069761498	0,109544512	0,122474487
Sem PeP5	Inóculo	Ponto 1	Ponto 2	Ponto 3	Ponto 4	Ponto 5	Ponto 6
Médias	0,21	0,37	0,4	0,52	0,98	1,38	1,45
N1	0,19	0,31	0,5	0,47	1,12	1,42	1,53
N2	0,2	0,39	0,43	0,6	0,9	1,39	1,34
N3	0,17	0,49	0,34	0,58	0,91	1,22	1,53
N4	0,28	0,29	0,33	0,43	0,99	1,49	1,4
DP	0,048304589	0,090921211	0,080415587	0,082865353	0,101653005	0,114600756	0,095568475
valor H		0,7500	1,3333	5,3333	5,3333	5,3333	5,3976
p-valor		0,3865	0,2482	0,0209	0,0209	0,0209	0,0202

Fig 9: Valores, Médias e Desvios Padrão, valores de H e p-valor das Curvas de *S. epidermidis* ATCC 25923 na presença e ausência de Epidermina em UFC/mL

Com Epi	Inóculo	Ponto 1	Ponto 2	Ponto 3	Ponto 4	Ponto 5	Ponto 6
Média	8,50E+06	8,00E+07	1,10E+09	2,60E+09	7,10E+08	1,40E+09	1,00E+10
N1	6,40E+06	7,90E+07	1,10E+09	2,50E+09	9,10E+08	1,10E+09	7,00E+09
N2	7,90E+06	7,30E+07	9,00E+08	1,90E+09	6,50E+08	8,00E+08	1,00E+10
N3	9,80E+06	7,60E+07	6,00E+08	1,70E+09	7,20E+08	1,10E+09	1,10E+10
N4	9,90E+06	9,20E+07	1,80E+09	4,30E+09	5,60E+08	2,60E+09	1,20E+10
DP	1,68E+06	8,37E+06	5,10E+08	1,18E+09	1,49E+08	8,12E+08	2,16E+09
Sem Epi							
Médias	Inóculo	Ponto 1	Ponto 2	Ponto 3	Ponto 4	Ponto 5	Ponto 6
N1	5,80E+06	8,00E+07	6,70E+08	4,60E+09	1,10E+09	1,00E+10	>10E+10
N2	4,70E+06	6,00E+07	6,80E+08	3,40E+09	9,00E+08	5,00E+09	
N3	5,20E+06	7,40E+07	6,30E+08	4,10E+09	7,00E+08	9,00E+09	
N4	4,90E+06	7,60E+07	7,90E+08	5,50E+09	1,00E+09	1,10E+10	
DP	8,40E+06	1,10E+08	5,80E+08	5,40E+09	1,80E+09	1,50E+10	
valor H	1,75E+06	2,12E+07	8,98E+07	1,02E+09	4,83E+08	4,16E+09	
p-valor	0,1898	2,0833	2,0833	3,0000	2,0833	5,3976	
	0,6631	0,1489	0,0833	0,1489	0,1489	0,0202	

Fig 10: Valores, Médias e Desvios Padrão, valores de H e p-valor das Curvas de *S. epidermidis* ATCC 25923 na presença e ausência de Epidermina em D.O

Com Epi	Inóculo	Ponto 1	Ponto 2	Ponto 3	Ponto 4	Ponto 5	Ponto 6
Médias	0,278	0,434	0,69	0,97	1,2	1,3	1,6
N1	0,29	0,45	0,71	0,92	1,23	1,32	1,6
N2	0,3	0,39	0,64	1,08	1,4	1,1	1,8
N3	0,25	0,41	0,73	1,06	0,98	1,3	1,54
N4	0,27	0,48	0,68	0,82	1,19	1,5	1,46
DP	0,022173558	0,040311289	0,0391578	0,122746351	0,172626765	0,163605216	0,145143607
Sem Epi							
Médias	Inóculo	Ponto 1	Ponto 2	Ponto 3	Ponto 4	Ponto 5	Ponto 6
N1	0,278	0,422	0,729	1,09	1,5	1,9	2,3
N2	0,28	0,4	0,67	1,2	1,5	1,9	2,3
N3	0,29	0,39	0,72	1	1,6	2,1	2,4
N4	0,3	0,41	0,68	1,1	1,4	1,8	2,1
DP	0,242	0,48	0,81	1,06	1,5	1,8	2,4
valor H	0,025350871	0,040824829	0,063770422	0,084063468	0,081649658	0,141421356	0,141421356
p-valor	0,1944	0,1898	0,1898	1,7078	4,8018	5,3976	5,3976
	0,6592	0,6631	0,6631	0,1913	0,0284	0,0202	0,0202

Fig 11: Valores, Médias e Desvios Padrão, valores de H e p-valor das Curvas de S. epidermidis 634648 na presença e ausência de Epidermina em UFC/mL

Com Epi	Inóculo	Ponto 1	Ponto 2	Ponto 3	Ponto 4	Ponto 5	Ponto 6
Média	4,90E+06	9,20E+07	9,70E+08	2,60E+09	7,10E+08	3,20E+08	3,00E+08
N1	4,80E+06	6,50E+07	9,60E+08	3,30E+09	8,60E+08	3,10E+08	2,20E+08
N2	6,30E+06	9,80E+07	6,50E+08	3,70E+09	6,80E+08	2,40E+08	2,80E+08
N3	2,80E+06	7,40E+07	9,80E+08	2,10E+09	5,90E+08	2,30E+08	3,30E+08
N4	5,70E+06	1,31E+08	1,29E+09	1,30E+09	7,10E+08	5,00E+08	3,70E+08
DP	1,53E+06	2,95E+07	2,61E+08	1,10E+09	1,12E+08	1,25E+08	6,48E+07
Sem Epi	Inóculo	Ponto 1	Ponto 2	Ponto 3	Ponto 4	Ponto 5	Ponto 6
Médias	4,30E+06	7,60E+07	6,80E+08	4,60E+09	1,10E+09	1,30E+09	2,00E+09
N1	3,10E+06	7,90E+07	7,70E+08	4,50E+09	1,50E+09	8,50E+08	2,00E+09
N2	3,90E+06	8,20E+07	6,30E+08	3,80E+09	7,00E+08	9,90E+08	1,70E+09
N3	5,10E+06	5,60E+07	4,20E+08	4,10E+09	9,00E+08	1,10E+09	1,90E+08
N4	5,10E+06	8,70E+07	9,00E+08	6,00E+09	1,30E+09	2,26E+09	2,40E+08
DP	9,80E+05	1,37E+07	2,05E+08	9,76E+08	3,65E+08	6,48E+08	9,52E+08
valor H	0,3333	3,0000	5,3333	3,0000	5,3333	5,3333	0,0833
p-valor	0,5637	0,0833	0,0209	0,0833	0,0209	0,0209	0,7728

Fig 12: Valores, Médias e Desvios Padrão, valores de H e p-valor das Curvas de Crescimento de S. epidermidis 634648 na presença e ausência de Epidermina em D.O

Com Epi	Inóculo	Ponto 1	Ponto 2	Ponto 3	Ponto 4	Ponto 5	Ponto 6
Médias	0,29	0,489	0,789	0,98	1,145	1,34	1,67
N1	0,3	0,43	0,76	0,97	1,2	1,4	1,6
N2	0,28	0,48	0,79	1,03	1,2	1,2	1,6
N3	0,31	0,45	0,73	1,04	1,1	1,2	1,78
N4	0,27	0,6	0,88	0,88	1,06	1,4	1,7
DP	0,018257419	0,076157731	0,064807407	0,073484692	0,071180522	0,115470054	0,087177979
Sem PeP5	Inóculo	Ponto 1	Ponto 2	Ponto 3	Ponto 4	Ponto 5	Ponto 6
Médias	0,29	0,422	0,98	1,24	1,65	1,79	1,987
N1	0,3	0,42	0,97	1,1	1,5	1,7	1,9
N2	0,25	0,41	1,03	1,2	1,48	1,69	2,2
N3	0,26	0,45	1,04	1,2	1,95	1,7	1,86
N4	0,35	0,408	0,88	1,46	1,67	2,07	1,96
DP	0,045460606	0,019390719	0,073484692	0,154056267	0,217408985	0,186726181	0,152315462
valor H	3,5633	4,7440	5,3976	5,3976	5,3976	5,309	5,3976
p-valor	0,0591	0,0294	0,0202	0,0202	0,0202	0,0187	0,0202

Fig 13: Valores, Médias e Desvios Padrão, valores de H e p-valor das Curvas de *Corynebacterium sp. 633544* na presença e ausência de Epidermina em UFC/mL

Com Epi	Inóculo	Ponto 1	Ponto 2	Ponto 3	Ponto 4	Ponto 5	Ponto 6
Média	5,60E+06	1,40E+07	1,20E+07	3,60E+07	9,60E+06	1,20E+07	4,50E+06
N1	5,40E+06	1,40E+07	7,50E+06	3,20E+07	8,30E+06	1,60E+07	5,70E+06
N2	4,30E+06	1,60E+07	1,30E+07	2,40E+07	6,70E+06	8,00E+06	4,40E+06
N3	5,60E+06	1,30E+07	1,00E+07	3,90E+07	9,10E+06	7,90E+06	2,30E+06
N4	7,10E+06	1,30E+07	1,75E+07	4,90E+07	1,43E+07	1,61E+07	5,50E+06
DP	1,15E+06	1,41E+06	4,30E+06	1,06E+07	3,29E+06	4,68E+06	1,56E+06
Sem Epi	Inóculo	Ponto 1	Ponto 2	Ponto 3	Ponto 4	Ponto 5	Ponto 6
Médias	6,30E+06	1,40E+07	2,40E+07	1,10E+08	1,30E+08	1,30E+09	>10E+10
N1	5,30E+06	1,30E+07	1,70E+07	1,20E+08	7,00E+07	1,10E+09	
N2	6,20E+06	1,50E+07	2,80E+07	6,70E+07	9,20E+07	7,80E+08	
N3	5,10E+06	9,00E+06	2,10E+07	9,10E+07	1,62E+08	1,10E+09	
N4	8,60E+06	1,90E+07	3,00E+07	1,62E+08	1,96E+08	2,20E+09	
DP	1,61E+06	4,16E+06	6,06E+06	4,09E+07	5,89E+07	6,22E+08	
valor H	0,0843	4,0833	5,3333	5,3333	5,3333	5,3976	
p-valor	0,7715	0,0433	0,0209	0,0209	0,0209	0,0202	

Fig 14: Valores, Médias e Desvios Padrão, valores de H e p-valor das Curvas de *Corynebacterium sp. 633544* na presença e ausência de Epidermina em D.O

Com Epi	Inóculo	Ponto 1	Ponto 2	Ponto 3	Ponto 4	Ponto 5	Ponto 6
Médias	0,21	0,38	0,25	0,23	0,32	0,35	0,47
N1	0,24	0,38	0,16	0,19	0,3	0,32	0,42
N2	0,14	0,41	0,29	0,34	0,24	0,17	0,29
N3	0,26	0,28	0,21	0,28	0,23	0,36	0,5
N4	0,23	0,45	0,34	0,11	0,51	0,55	0,67
DP	0,053150729	0,072571804	0,080415587	0,10095049	0,130384048	0,156418243	0,15895492
Sem Epi	Inóculo	Ponto 1	Ponto 2	Ponto 3	Ponto 4	Ponto 5	Ponto 6
Médias	0,21	0,4	0,43	0,6	1,173	2,2	2,4
N1	0,23	0,4	0,42	0,52	1,173	2	2,3
N2	0,3	0,29	0,53	0,47	1,182	2,4	2,43
N3	0,12	0,5	0,48	0,62	0,97	2,28	2,26
N4	0,2	0,4	0,29	0,79	1,364	2,12	2,61
DP	0,074554231	0,085780728	0,103601802	0,141185457	0,161005952	0,175878746	0,157691682
valor H	0,0843	3,5633	5,3333	5,3333	5,3333	5,3333	5,3333
p-valor	0,7715	0,0591	0,0209	0,0209	0,0209	0,0209	0,0209

FIGURA 15: Efeito da Pep5 na aderência celular de *S. epidermidis* ATCC 25923 em UFC/mm2

Protocolo 1		N1	N2	N3	N4	N5	Média	DP	valor de H	p-valor
UFC/mm2 Inicial										
6hcom		3,82E+02	3,58E+02	3,82E+02	5,73E+02	4,53E+02	4,17E+02	8,77E+01	6,9018	0,0086
6hsem		5,97E+04	6,92E+04	6,92E+04	6,21E+04	6,21E+04	6,42E+04	4,46E+03		
		1,26E+06	1,36E+06	1,38E+06	1,15E+06	1,53E+06	1,32E+06	1,42E+05		
12hcom		1,41E+06	1,34E+06	1,29E+06	1,34E+06	1,07E+06	1,28E+06	1,27E+05	6,9444	0,0084
12hsem		2,63E+07	2,39E+07	3,34E+07	2,63E+07	3,34E+07	2,81E+07	4,46E+06		
Protocolo 2										
6hcom		7,88E+04	7,16E+04	8,35E+04	7,40E+04	9,79E+04	8,02E+04	1,04E+04	6,9018	0,0086
6hsem		1,81E+06	1,89E+06	1,89E+06	1,81E+06	1,91E+06	1,86E+06	4,46E+04		
12hcom		1,29E+06	1,31E+06	1,38E+06	1,26E+06	1,43E+06	1,33E+06	6,96E+04	6,8182	0,0090
12hsem		2,63E+07	3,34E+07	3,10E+07	2,39E+07	2,86E+07	2,82E+07	3,77E+06		
Protocolo 3										
6hcom		1,07E+05	1,03E+05	1,12E+05	1,07E+05	1,19E+05	1,10E+05	6,31E+03	6,9018	0,0086
6hsem		1,89E+06	1,96E+06	2,05E+06	2,00E+06	2,00E+06	1,98E+06	6,31E+04		
12hcom		5,01E+05	5,97E+05	4,06E+05	4,53E+05	6,68E+05	5,08E+05	1,07E+05	6,9018	0,0086
12hsem		3,34E+07	2,86E+07	3,34E+07	3,10E+07	2,86E+07	3,09E+07	2,39E+06		

FIGURA 16: Efeito da Pep5 na aderência celular de *S. epidermidis* ATCC 25923 em Densidade ótica

Protocolo 1		N1	N2	N3	N4	N5	Média	DP	valor de H	p-valor
UFC/mm2 Inicial										
6hcom		0,23	0,3	0,27	0,21	0,24	0,25	0,035355339	6,9876	0,0082
6hsem		0,29	0,3	0,31	0,27	0,43	0,32	0,063245553		
		0,66	0,69	0,72	0,69	0,69	0,69	0,021213203		
12hcom		0,62	0,67	0,72	0,54	0,6	0,63	0,068556546	6,8182	0,0090
12hsem		1,02	0,9	0,97	1,1	1,01	1	0,073143694		
Protocolo 2										
6hcom		0,28	0,29	0,35	0,31	0,42	0,33	0,057008771	6,8182	0,0090

6hsem	0,76	0,79	0,81	0,74	0,75	77	0,029154759		
12hcom	0,58	0,63	0,64	0,56	0,69	0,62	0,051478151	6,8182	0,0090
12hsem	1,13	1	1,03	1,1	1,24	1,1	0,094074439		
Protocolo 3	N1	N2	N3	N4	N5	Média	DP	valor de H	p-valor
6hcom	0,45	0,48	0,49	0,45	0,48	0,47	0,018708287	6,9444	0,0084
6hsem	0,86	0,78	0,81	0,85	0,85	0,83	0,03391165		
12hcom	0,56	0,59	0,57	0,56	0,67	0,59	0,046368092	6,8598	0,0088
12hsem	1,2	1,1	1,12	1	1,08	1,1	0,072111026		

FIGURA 17: Efeito da Epidermina na aderência celular de *S. epidermidis* ATCC 25923 em UFC/mm2.

Protocolo 1	N1	N2	N3	N4	N5	Média	DP	valor de H	p-valor
UFC/mm2 Inicial	5,49E+02	5,73E+02	5,01E+02	5,73E+02	5,49E+02	5,48E+02	3,38E+01		
6hcom	7,88E+04	8,59E+04	1,05E+05	6,44E+04	3,58E+04	6,47E+04	1,69E+04	6,8598	0,0088
6hsem	4,53E+05	9,07E+05	8,11E+05	2,86E+05	2,86E+05	4,34E+05	2,93E+05		
12hcom	1,89E+06	1,65E+06	1,69E+06	1,74E+06	1,62E+06	1,71E+06	1,03E+05	6,8182	0,0090
12hsem	1,74E+07	1,86E+07	1,79E+07	1,81E+07	1,62E+07	1,76E+07	4,97E+05		
Protocolo 2	N1	N2	N3	N4	N5	Média	DP	valor de H	p-valor
6hcom	6,68E+04	7,40E+04	6,92E+04	7,64E+04	5,97E+04	6,87E+04	4,36E+03	6,8598	0,0088
6hsem	7,40E+05	9,55E+05	1,26E+06	9,55E+05	1,10E+06	9,71E+05	2,16E+05		
12hcom	1,29E+06	1,36E+06	1,29E+06	1,31E+06	1,43E+06	1,33E+06	3,38E+04	7,0313	0,0080
12hsem	2,63E+07	2,86E+07	2,63E+07	2,63E+07	2,39E+07	2,62E+07	1,19E+06		
Protocolo 3	N1	N2	N3	N4	N5	Média	DP	valor de H	p-valor
6hcom	1,10E+06	8,83E+05	1,05E+06	6,21E+05	4,06E+05	7,07E+05	2,16E+05	6,8182	0,0090
6hsem	5,01E+06	5,97E+06	8,35E+06	7,64E+06	5,25E+06	6,19E+06	1,53E+06		
12hcom	8,11E+05	9,31E+05	9,79E+05	1,31E+06	1,34E+06	1,03E+06	2,15E+05	6,8598	0,0088
12hsem	2,86E+07	4,30E+07	2,39E+07	2,39E+07	4,77E+07	3,07E+07	9,04E+06		

FIGURA 18: Efeito da Epidermina na aderência celular de *S. epidermidis* ATCC 25923 em Densidade ótica

Protocolo 1		N1	N2	N3	N4	N5	Média	DP	valor de H	p-valor
UFC/mm2 Inicial		0,287	0,23	0,24	0,267	0,251	0,255	0,022549945		
6hcom		0,42	0,47	0,51	0,43	0,42	0,45	0,039370039	6,8598	0,0088
6hsem		0,91	0,78	0,87	0,88	0,81	0,85	0,053385391		
12hcom		0,71	0,77	0,72	0,69	0,66	0,71	0,040620192	6,8182	0,0090
12hsem		1,57	1,49	1,28	1,29	1,32	1,39	0,131719399		
Protocolo 2		N1	N2	N3	N4	N5	Média	DP	valor de H	p-valor
6hcom		0,47	0,54	0,43	0,45	0,41	0,46	0,05	6,8182	0,0090
6hsem		0,91	0,86	1,04	1,1	0,89	0,96	0,104163333		
12hcom		0,97	0,65	0,71	0,63	0,67	0,69	0,139570771	5,7709	0,0163
12hsem		0,93	1,19	1,28	1,07	1,38	1,17	0,176210102		
Protocolo 3		N1	N2	N3	N4	N5	Média	DP	valor de H	p-valor
6hcom		0,53	0,56	0,52	0,49	0,5	0,52	0,027386128	6,8182	0,0090
6hsem		0,81	1	0,98	0,86	1,2	0,97	0,15132746		
12hcom		1,1	0,89	0,91	0,98	0,87	0,93	0,093541435	6,9018	0,0086
12hsem		1,43	1,2	1,24	1,43	1,2	1,3	0,119791486		

FIGURA 19: Efeito da PeP5 na aderência celular de *S. epidermidis* 634648 em UFC/mm2

Protocolo 1		N1	N2	N3	N4	N5	Média	DP	valor de H	p-valor
UFC/mm2 Inicial		3,10E+03	3,58E+03	2,39E+03	2,86E+03	2,39E+03	2,80E+03	5,06E+02		
6hcom		6,68E+04	8,11E+04	7,16E+04	6,92E+04	8,11E+04	7,35E+04	6,75E+03	6,8598	0,0088
6hsem		4,06E+05	5,25E+05	5,01E+05	4,53E+05	2,63E+05	4,04E+05	1,04E+05		
12hcom		3,82E+05	4,06E+05	5,25E+05	4,06E+05	4,30E+05	4,24E+05	5,60E+04	6,9444	0,0084
12hsem		3,58E+06	4,53E+06	3,58E+06	4,30E+06	4,30E+06	4,02E+06	4,46E+05		
Protocolo 2		N1	N2	N3	N4	N5	Média	DP	valor de H	p-valor

6hcom	5,49E+04	6,92E+04	7,40E+04	6,92E+04	5,49E+04	6,34E+04	8,93E+03	6,9876	0,0082
6hsem	2,86E+05	2,39E+05	2,86E+05	2,63E+05	2,39E+05	2,61E+05	2,39E+04		
12hcom	5,01E+05	5,73E+05	5,49E+05	5,25E+05	5,97E+05	5,47E+05	3,77E+04	6,8182	0,0090
12hsem	5,49E+06	5,73E+06	4,77E+06	5,01E+06	5,25E+06	5,23E+06	3,77E+05		
Protocolo 3	N1	N2	N3	N4	N5	Média	DP	valor de H	p-valor
6hcom	2,00E+05	2,17E+05	2,05E+05	2,03E+05	2,12E+05	2,07E+05	6,96E+03	6,8182	0,0090
6hsem	1,12E+06	1,15E+06	1,24E+06	1,22E+06	1,00E+06	1,14E+06	9,40E+04		
12hcom	5,97E+05	6,21E+05	6,68E+05	6,92E+05	5,25E+05	6,15E+05	6,54E+04	valor de H	p-valor
12hsem	7,88E+06	4,30E+06	6,44E+06	5,97E+06	6,44E+06	5,97E+06	1,29E+06		

FIGURA 20: Efeito da PeP5 na aderência celular de *S. epidermidis* 634648 em Densidade ótica

Protocolo 1	N1	N2	N3	N4	N5	Média	DP	valor de H	p-valor
UFC/mm2 Inicial	0,19	0,24	0,23	0,21	0,23	0,22	0,02		
6hcom	0,39	0,37	0,39	0,38	0,36	0,39	0,013038405	6,9018	0,0086
6hsem	0,71	0,67	0,72	0,71	0,74	0,71	0,025495098		
12hcom	0,65	0,64	0,72	0,76	0,63	0,68	0,057008771	6,8182	0,0090
12hsem	1,14	1,23	1,25	1,12	1,01	1,15	0,09617692		
Protocolo 2	N1	N2	N3	N4	N5	Média	DP	valor de H	p-valor
6hcom	0,42	0,39	0,41	0,39	0,51	0,38	0,049799598	6,9444	0,0084
6hsem	0,67	0,56	0,67	0,7	0,7	0,66	0,057879185		
12hcom	0,74	0,69	0,67	0,72	0,73	0,71	0,029154759	6,8182	0,0090
12hsem	1,13	1,14	1,1	0,98	1,15	1,1	0,069641941		
Protocolo 3	N1	N2	N3	N4	N5	Média	DP	valor de H	p-valor
6hcom	0,41	0,44	0,39	0,46	0,4	0,42	0,029154759	6,8182	0,0090
6hsem	0,81	0,71	0,72	0,83	0,78	0,77	0,053385391		
12hcom	0,57	0,6	0,61	0,59	0,58	0,59	0,015811388	6,8182	0,0090
12hsem	1,1	1,02	1	1,3	1,18	1,12	0,12328828		

FIGURA 21: Efeito da Epidermina na aderência celular de *S. epidermidis* 634648 em UFC/mm²

Protocolo 1		N1	N2	N3	N4	N5	Média	DP	valor de H	p-valor
UFC/mm ² Inicial	6hcom	5,49E+03	7,88E+03	1,03E+04	9,79E+03	5,97E+03	7,39E+03	2,16E+03	6,9018	0,0086
	6hsem	8,11E+04	7,64E+04	9,07E+04	8,83E+04	9,79E+04	8,62E+04	8,37E+03		
12hcom		5,73E+05	5,97E+05	5,01E+05	5,73E+05	5,01E+05	5,46E+05	4,46E+04	6,9876	0,0082
	12hsem	4,30E+05	4,77E+05	5,01E+05	4,30E+05	4,30E+05	4,52E+05	3,38E+04		
Protocolo 2									6,9018	0,0086
	6hcom	5,49E+04	6,21E+04	5,97E+04	5,73E+04	4,06E+04	5,36E+04	8,44E+03		
6hsem	8,11E+05	8,11E+05	8,35E+05	7,40E+05	7,40E+05	7,86E+05	4,46E+04			
12hcom		5,97E+05	5,49E+05	5,73E+05	6,44E+05	5,01E+05	5,69E+05	5,34E+04	6,8182	0,0090
	12hsem	5,73E+06	5,01E+06	5,25E+06	5,49E+06	5,97E+06	5,47E+06	3,77E+05		
Protocolo 3									6,9876	0,0082
	6hcom	1,12E+05	1,29E+05	1,05E+05	9,31E+04	1,10E+05	1,09E+05	1,30E+04		
6hsem	3,10E+05	2,63E+05	3,10E+05	2,39E+05	3,10E+05	2,83E+05	3,38E+04			
12hcom		8,11E+05	7,40E+05	7,40E+05	7,16E+05	5,73E+05	7,06E+05	8,77E+04	6,9018	0,0086
	12hsem	5,73E+06	5,49E+06	6,21E+06	5,73E+06	4,30E+06	5,40E+06	7,16E+05		

FIGURA 22: Efeito da Epidermina na aderência celular de *S. epidermidis* 634648 em Densidade ótica

Protocolo 1		N1	N2	N3	N4	N5	Média	DP	valor de H	p-valor
UFC/mm ² Inicial	6hcom	0,181	0,18	0,189	0,21	0,24	0,2	0,023177575	6,8182	0,0090
	6hsem	0,4	0,43	0,46	0,45	0,51	0,45	0,03		
12hcom		1,09	0,92	0,95	0,87	0,82	0,93	0,052630789	6,9876	0,0082
	12hsem	0,62	0,69	0,72	0,65	0,67	0,67	0,026457513		
12hsem		1,2	1,2	1,18	1,17	1,2	1,19	0,013038405		

Protocolo 2		N1	N2	N3	N4	N5	Média	DP	valor de H	p-valor
6hcom	0,33	0,38	0,41	0,36	0,37	0,37	0,37	0,019235384	6,8182	0,0090
6hsem	1,08	1,02	1,14	0,93	0,98	1,03	1,03	0,077781746		
12hcom	0,84	0,58	0,71	0,69	0,63	0,69	0,69	0,053851648	6,8598	0,0088
12hsem	1,24	1,25	1,29	1,27	1,25	1,26	1,26	0,016733201		
Protocolo 3		N1	N2	N3	N4	N5	Média	DP	valor de H	p-valor
6hcom	0,65	0,63	0,57	0,61	0,54	0,6	0,6	0,035355339	6,8598	0,0088
6hsem	1,05	0,91	0,89	0,86	0,89	0,92	0,92	0,023021729		
12hcom	0,63	0,73	0,8	0,7	0,69	0,71	0,71	0,043931765	6,8598	0,0088
12hsem	1,58	1,29	1,23	1,32	1,32	1,29	1,29	0,036742346		

FIGURA 23: Efeito da PeP5 na aderência celular de *Corynebacterium sp.* 633544 em UFC/mm2

Protocolo 1		N1	N2	N3	N4	N5	Média	DP	valor de H	p-valor
UFC/mm2 inicial		3,34E+03	2,39E+03	3,34E+03	2,39E+03	2,86E+03	2,80E+03	4,77E+02		
6hcom	7,88E+04	8,35E+04	7,16E+04	8,35E+04	1,12E+05	8,40E+04	8,40E+04	1,55E+04	6,9018	0,0086
6hsem	1,29E+06	1,31E+06	1,48E+06	1,29E+06	1,55E+06	1,38E+06	1,38E+06	1,23E+05		
12hcom	9,55E+05	1,05E+06	1,03E+06	8,35E+05	1,15E+06	9,91E+05	9,91E+05	1,16E+05	6,8598	0,0088
12hsem	7,64E+06	8,11E+06	8,83E+06	7,64E+06	8,35E+06	8,09E+06	8,09E+06	5,06E+05		
Protocolo 2		N1	N2	N3	N4	N5	Média	DP	valor de H	p-valor
6hcom	8,59E+04	9,79E+04	9,07E+04	9,79E+04	1,05E+05	9,50E+04	9,50E+04	7,36E+03	6,8598	0,0088
6hsem	1,22E+06	1,50E+06	1,29E+06	1,38E+06	1,58E+06	1,38E+06	1,38E+06	1,48E+05		
12hcom	7,64E+05	8,11E+05	8,83E+05	7,64E+05	8,35E+05	8,09E+05	8,09E+05	5,06E+04	6,9018	0,0086
12hsem	1,07E+07	1,03E+07	1,03E+07	1,17E+07	1,19E+07	1,09E+07	1,09E+07	7,92E+05		
Protocolo 3		N1	N2	N3	N4	N5	Média	DP	valor de H	p-valor
6hcom	8,11E+04	9,31E+04	7,88E+04	1,00E+05	8,83E+04	8,76E+04	8,76E+04	8,77E+03	6,8598	0,0088
6hsem	8,59E+05	1,07E+06	1,00E+06	9,79E+05	8,59E+05	9,47E+05	9,47E+05	9,40E+04		

12hcom	6,68E+05	8,11E+05	7,88E+05	7,40E+05	6,92E+05	7,36E+05	6,08E+04	6,8598	0,0088
12hsem	1,10E+07	1,26E+07	1,22E+07	1,26E+07	1,12E+07	1,19E+07	7,92E+05		

FIGURA 24: Efeito da PePS na aderência celular de *Corynebacterium sp.* 633544, em Densidade ótica

Protocolo 1	N1	N2	N3	N4	N5	Média	DP	valor de H	p-valor
UFC/mm2 Inicial	0,23	0,2	0,24	0,23	0,16	0,212	0,032710854		
6hcom	0,46	0,35	0,31	0,3	0,38	0,36	0,064420494	6,8598	0,0088
6hsem	0,65	0,69	0,68	0,68	0,7	0,68	0,018708287		
12hcom	0,54	0,6	0,54	0,49	0,63	0,56	0,055226805	6,8598	0,0088
12hsem	1,13	1,12	1,2	1,17	1,08	1,14	0,046368092		

Protocolo 2	N1	N2	N3	N4	N5	Média	DP	valor de H	p-valor
6hcom	0,34	0,35	0,29	0,32	0,3	0,32	0,025495098	6,8182	0,0090
6hsem	0,7	0,67	0,71	0,89	0,68	0,73	0,090829511		
12hcom	0,61	0,69	0,58	0,67	0,7	0,65	0,052440442	6,8598	0,0088
12hsem	1,04	1,12	1,12	1,3	1,17	1,15	0,09591663		

Protocolo 3	N1	N2	N3	N4	N5	Média	DP	valor de H	p-valor
6hcom	0,34	0,4	0,38	0,39	0,44	0,39	0,036055513	6,8182	0,0090
6hsem	0,76	0,68	0,72	0,65	0,74	0,71	0,04472136		
12hcom	0,68	0,71	0,72	0,81	0,78	0,74	0,053385391	6,8182	0,0090
12hsem	1,29	1,3	1,1	1,26	1,05	1,2	0,116404467		

FIGURA 25: Efeito da Epidermina na aderência celular de *Corynebacterium sp.* 633544 em UFC/mm2

Protocolo 1	N1	N2	N3	N4	N5	Média	DP	Valor de H	p-valor
UFC/mm2 inicial	1,34E+03	7,16E+02	1,17E+03	9,31E+02	1,34E+03	1,04E+03	2,71E+02		
6hcom	3,10E+04	2,39E+04	3,34E+04	3,34E+04	3,34E+04	3,05E+04	4,13E+03	6,9876	0,0082
6hsem	8,11E+05	1,34E+06	1,05E+06	1,12E+06	1,29E+06	1,09E+06	2,09E+05		
12hcom	5,49E+05	5,73E+05	4,53E+05	4,53E+05	5,97E+05	5,18E+05	6,75E+04	6,8588	0,0088
12hsem	4,30E+06	5,25E+06	4,06E+06	5,97E+06	5,49E+06	4,90E+06	8,09E+05		

Protocolo 2		N1	N2	N3	N4	N5	Média	DP	valor de H	p-valor
6hcom		1,55E+05	1,53E+05	1,62E+05	1,60E+05	1,58E+05	1,57E+05	3,77E+03	6,8182	0,009
6hsem		1,07E+06	9,07E+05	7,40E+05	8,59E+05	9,55E+05	8,93E+05	1,23E+05		
12hcom		4,30E+05	7,64E+05	5,73E+05	5,25E+05	4,53E+05	5,27E+05	1,33E+05	6,8182	0,009
12hsem		9,31E+06	1,15E+07	1,22E+07	7,64E+06	1,31E+07	1,03E+07	2,23E+06		
Protocolo 3		N1	N2	N3	N4	N5	Média	DP	valor de H	p-valor
6hcom		4,53E+04	9,31E+04	5,49E+04	6,68E+04	5,01E+04	5,82E+04	1,91E+04	6,8182	0,009
6hsem		9,31E+05	9,79E+05	1,19E+06	5,49E+05	1,24E+06	8,99E+05	2,75E+05		
12hcom		6,44E+05	5,73E+05	7,40E+05	7,64E+05	6,21E+05	6,60E+05	8,09E+04	6,8182	0,009
12hsem		1,15E+07	1,19E+07	1,12E+07	1,22E+07	1,29E+07	1,19E+07	6,54E+05		

FIGURA 26: Efeito da Epidermina na aderência celular de *Corynebacterium* sp. 633544 em Densidade ótica

Protocolo 1		N1	N2	N3	N4	N5	Média	DP	valor de H	p-valor
UFC/mm ² Inicial		0,19	0,22	0,22	0,21	0,21	0,21	0,012247449		
6hcom		0,38	0,43	0,41	0,38	0,4	0,4	0,021213203	6,8598	0,0088
6hsem		0,76	0,67	0,75	0,8	0,92	0,78	0,091378334		
12hcom		0,52	0,53	0,61	0,51	0,73	0,58	0,092736185	6,8182	0,0090
12hsem		0,97	0,99	1,1	1,2	1,24	1,1	0,121037184		
Protocolo 2		N1	N2	N3	N4	N5	Média	DP	valor de H	p-valor
6hcom		0,28	0,33	0,34	0,29	0,36	0,32	0,03391165	6,8182	0,0090
6hsem		0,75	0,67	0,76	0,78	0,69	0,73	0,047434165		
12hcom		0,59	0,69	0,71	0,6	0,61	0,64	0,055677644	6,8182	0,0090
12hsem		1,2	1,09	1,3	0,87	1,04	1,1	0,163248277		
Protocolo 3		N1	N2	N3	N4	N5	Média	DP	valor de H	p-valor
6hcom		0,39	0,41	0,42	0,41	0,37	0,4	0,02	6,8598	0,0088
6hsem		0,74	0,83	0,71	0,73	0,79	0,76	0,048989795		

12hcom	0,54	0,56	0,56	0,54	0,45	0,53	0,045825757	6,9018	0.0086
12hsem	1,1	1,08	1,2	0,98	1	1,09	0,087863531		