

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

FACULDADE DE FARMÁCIA

PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**Avaliação da penetração de agentes antimicrobianos em biofilme de
Staphylococcus spp. e *Pseudomonas aeruginosa*: Considerações Físico-
Químicas**

CAMILLE CATANI FERREIRA PINTO

Porto Alegre, 2011.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

FACULDADE DE FARMÁCIA

PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**Avaliação da penetração de agentes antimicrobianos em biofilme de
Staphylococcus spp. e *Pseudomonas aeruginosa*: Considerações Físico-
Químicas**

Dissertação apresentada por **CAMILLE CATANI
FERREIRA PINTO** para obtenção do GRAU DE
MESTRE em Ciências Farmacêuticas

ORIENTADOR: PROF. DR. PEDRO EDUARDO FRÖHLICH

Porto Alegre, 2011.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, em nível Mestrado Acadêmico, da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e aprovada em 31.03.2011, pela Banca Examinadora constituída por:

Prof. Dr. Amauri Braga Simonetti

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Prof^a. Dra. Ana Lúcia Peixoto de Freitas

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Prof^a. Dra. Ana Maria Bergold

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Prof. Dr. José Carlos Germani

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

P659a Pinto, Camille Catani Ferreira

Avaliação da penetração de agentes antimicrobianos em biofilme de *Staphylococcus* spp. e *Pseudomonas aeruginosa* : considerações físico-químicas / Camille Catani Ferreira Pinto – Porto Alegre : UFRGS, 2011. – xviii, 103 p. : il.

Dissertação (mestrado). UFRGS. Faculdade de Farmácia. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas.

1. Biofilmes. 2. Antimicrobianos. 3. *Staphylococcus*. 4. *Pseudomonas aeruginosa*. 5. Ácido edético. I. Fröhlich, Pedro Eduardo. II. Título.

CDU: 615.2.011: 616-074

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Produção de Padrões Secundários (LAPPS) e Laboratório de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Farmácia - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, com suporte financeiro CAPES .

Agradecimentos à CAPES, órgão que financiou a bolsa de estudos para o desenvolvimento deste trabalho, ao Laboratório de Análises Clínicas e Toxicológicas e ao LAPPS que disponibilizaram todos equipamentos e materiais necessários para a realização dos experimentos práticos na elaboração da presente dissertação.

Agradeço a todos que, de alguma maneira, me ajudaram na realização desta dissertação, em especial ao meu orientador Prof. Dr. Pedro Eduardo Fröhlich e a Ana Lúcia Souza Antunes que me acompanharam durante estes anos.

Sumário

Lista de Figuras	viii
Abstract	ix
Resumo	x
Lista de Abreviaturas e siglas	ix
1 Introdução	01
1.1 Objetivos	07
2 Revisão	09
2.1 <i>Staphylococcus</i> spp. e Biofilme	11
2.2 <i>Pseudomonas aeruginosa</i> e Biofilme	13
2.3 Antimicrobianos	14
2.4 Antimicrobianos e Resistência	16
2.5 Antimicrobianos e Biofilme	17
2.6 Propriedades Físico-Químicas e Farmacológicas dos Antimicrobianos	20
2.7 Outros Agentes contra Biofilme	33
3 PARTE 1: Avaliação da Eficácia de Vancomicina, Rifampicina, Gentamicina, Azitromicina, Eritromicina, Claritromicina, Clindamicina, Doxiciclina, Levofloxacino e Cloranfenicol em Biofilme de <i>Staphylococcus</i> spp.	35
4 PARTE 2: Avaliação de Propriedades Físico-Químicas dos Antimicrobianos que Podem Estar Envolvidas na sua Penetração e Eficácia em Biofilme de <i>Staphylococcus epidermidis</i>	39
5 PARTE 3: Tratamento com EDTA na Prevenção do Desenvolvimento de Biofilme	43

6 Discussão final	47
7 Conclusões finais	53
8 Referências	57

Lista de Figuras

Figura 1: Sulfametoxazol	21
Figura 2: Trimetoprima	22
Figura 3: Meticilina	23
Figura 4: Amoxicilina	23
Figura 5: Gentamicina	24
Figura 6: Doxiciclina	25
Figura 7: Claritromicina	26
Figura 8: Eritromicina	27
Figura 9: Azitromicina	28
Figura 10: Rifampicina	28
Figura 11: Clindamicina	29
Figura 12: Lincomicina	30
Figura 13: Vancomicina	31
Figura 14: Levofloxacino	32
Figura 15: Ciprofloxacino	32
Figura 16: Cloranfenicol	33
Figura 17: Quelato Metal-EDTA	34

Lista de Abreviaturas e Siglas

CVC: cateter venoso central

MIC: concentração inibitória mínima

MBIC: concentração inibitória mínima em biofilme

ESBL: betalactamases de espectro estendido

VRSA: *Staphylococcus aureus* resistentes a vancomicina

log P: coeficiente de partição

PABA: ácido para-aminobenzóico

MH: Müller-Hinton

ATCC: American Type Culture Collection

MBIC/MIC: razão entre MBIC e MIC

EDTA: ethylenediamine tetraacetic acid (ácido edético)

DO: densidade óptica (absorbância)

Resumo

O advento do uso de cateteres venosos centrais na prática médica trouxe muitos benefícios aos pacientes, porém está relacionado a um aumento na incidência de infecções por microrganismos multirresistentes. Além disso, freqüentemente ocorre colonização por bactérias produtoras de biofilme. Estes microrganismos se aderem ao material abiótico desses dispositivos intravenosos, ficando protegidos sob a matriz exopolissacarídica do biofilme. Isso faz com que sistema imunológico e antimicrobianos sejam incapazes de ter sua ação plena e, muitas vezes, não atingem os microrganismos mais internos. O motivo deste insucesso é porque muitos desses agentes biológicos e farmacológicos apresentam propriedades físico-químicas incompatíveis com a penetração nesta matriz.

Com o objetivo de determinar quais antimicrobianos são mais adequados para uso quando o microrganismo é produtor de biofilme e quais as propriedades físico-químicas que estão diretamente relacionadas à penetração do antimicrobiano na matriz polissacarídica, utilizou-se método colorimétrico com cristal violeta em microplacas modificado para obtenção de concentração inibitória mínima em biofilme (MBIC) e método já padronizado para concentração inibitória mínima (MIC). Para isso foram testados 10 antimicrobianos em *Staphylococcus* spp.: rifampicina, azitromicina, claritromicina, eritromicina, levofloxacino, gentamicina, doxiciclina, cloranfenicol, clindamicina e vancomicina. Para *Pseudomonas aeruginosa* foram testados os mesmos, exceto rifampicina e vancomicina.

A discrepância entre MIC e MBIC foi muito grande para vários fármacos, mostrando a necessidade de se avaliar estes parâmetros antes do início da farmacoterapia para uma escolha correta, especialmente em hospitais.

Os fármacos que apresentaram melhores resultados foram a rifampicina e os macrolídeos, enquanto que os menos efetivos foram vancomicina e clindamicina. Isso foi atribuído ao perfil lipofílico, porém com alguma solubilidade em água das melhores moléculas. Em contra ponto, a elevada área polar, complexidade e massa molar foram características negativas para a penetração em biofilme, resultando numa ineficácia para essas moléculas.

Além disso, também foi avaliado o tratamento de polímeros plásticos com EDTA, obtendo-se redução significativa da produção de biofilme nas placas tratadas com o agente químico.

Palavras-chaves: penetração em biofilme, rifampicina, azitromicina, claritromicina, eritromicina, levofloxacino, gentamicina, doxiciclina, cloranfenicol, clindamicina, vancomicina, EDTA.

Abstract

Evaluation of the penetration of antimicrobial agents on biofilm of *Staphylococcus* spp. and *Pseudomonas aeruginosa*: Physical-Chemical Considerations

The use of central venous catheters in medicine has brought benefits to the patients and represents a great advance in clinical practice, while on the other hand this device is related to an increase in the incidence of infections caused by multiresistant pathogens.

Furthermore, frequently, the catheters get colonized by biofilm producing bacteria. These microorganisms adhere to the abiotic material of the catheters keeping themselves protected underneath the exopolysaccharide matrix of biofilm, this way the immune system and antimicrobials are incapable to fulfill their action and, many times, are unable to reach internal bacteria. This fact is explained by the fact that many of the biological and pharmacological agents have physical-chemical properties incompatible with the penetration into the matrix.

Aiming to determine which antimicrobials are suitable for using when dealing with a biofilm producing microorganism and which physical-chemical properties are directly related to the agent penetration into the polysaccharide matrix, we used colorimetric method with crystal violet to obtain biofilm minimum inhibitory concentration (MBIC) and the already standardized method for minimum inhibitory concentration (MIC). To accomplish these 10 antimicrobials were tested in *Staphylococcus* spp.: rifampin, azithromycin, clarithromycin, erythromycin, levofloxacin, gentamicin, doxycycline, chloramphenicol, clindamycin and vancomycin. For *Pseudomonas aeruginosa* all antimicrobials except for rifampin and vancomycin were included.

There was a great difference between MIC and MBIC for many drugs, showing the need to evaluate these parameters before beginning treatment.

The drugs with better results were rifampin and macrolides, while the worst were vancomycin and clindamycin, which can be attributed to the lipophilic profile with some water solubility present in the molecules with better results. The characteristics associated with poor penetration into biofilm were high polar surface area, complexity and molecular weight.

Furthermore, the previous treatment of the plastic polymers with EDTA was assessed resulting in statistically significant reduction of biofilm production.

Key-words: biofilm penetration, rifampin, azithromycin, clarithromycin, erythromycin, levofloxacin, gentamicin, doxycycline, chloramphenicol, clindamycin and vancomycin, EDTA.

1 INTRODUÇÃO

No Brasil e no mundo, a infecção hospitalar é considerada um grave problema, que tem aumentado tanto em incidência quanto em complexidade, com implicações diretas no tratamento do paciente, aumento do tempo de hospitalização e conseqüente sobrecarga dos serviços de saúde. Aproximadamente 40 milhões de hospitalizações ocorrem por ano nos Estados Unidos, estimando-se que 2 milhões desses pacientes (aproximadamente 5 %) adquirem infecções nosocomiais. Em 1995, cerca de 90 mil mortes foram relacionadas com infecções hospitalares. A utilização de procedimentos invasivos para facilitar o diagnóstico ou tratamento do paciente hospitalizado e o uso de terapia antimicrobiana de amplo espectro trouxeram benefícios aos pacientes, mas, por outro lado, está sendo uma das causas do aumento na incidência de infecções por microrganismos multirresistentes (SOUZA E FIGUEIREDO, 2008).

Uma das principais causas de infecções nosocomiais e adquiridas na comunidade é o *Staphylococcus* spp. Muitas infecções causadas por estes agentes estão associadas com biofilme. Além desta espécie, a *Pseudomonas aeruginosa* é outra bastante relacionada com a produção de biofilme. Esta estrutura é composta por densos agregados de células microbianas embebidas em matriz polissacarídica viscosa, que se adere a uma superfície plástica. Os agregados celulares são compostos por inúmeras microcolônias de células e são permeados por canais de água e áreas intersticiais vazias. O fluxo de água através desses canais aumenta a oferta de nutrientes para as células do biofilme (RAAD et al., 1998).

Biofilmes podem ser definidos como “uma comunidade estruturada de células bacterianas envolvidas em uma matriz polimérica auto-produzida e

aderente a uma superfície inerte ou viva” (COSTERTON et al., 1999) ou em termos cooperativos como “um consórcio funcional de microrganismos organizados dentro de uma matriz exopolimérica extensa” (ELDER et al., 1995).

Para entender melhor o que é biofilme, é importante conhecer também porque as bactérias o produzem ou em resposta a quê. JEFFERSON (2004) elucidou essa questão ao discutir alguns desses motivos. Uma das possibilidades seria a formação do biofilme como uma forma de defesa, protegendo de condições nocivas. Poderia, também, ser um mecanismo para permanecer em um ambiente favorável, já que o corpo humano, ou pelo menos parte dele, é rico em nutrientes e relativamente estável (oxigênio, água e temperatura), o que o torna um lugar bastante atraente para microrganismos. Essa poderia ser uma das motivações para uma bactéria se fixar e começar a produzir biofilme, deixando o estado planctônico de crescimento. Outro motivo para isso ocorrer seria a possibilidade da utilização de benefícios cooperativos, ou seja, a formação de uma comunidade. Desse modo, o biofilme seria comparado a um organismo multicelular, no qual as bactérias apresentariam um comportamento altruísta mostrando benefícios mútuos (JEFFERSON, 2004).

Segundo ANWAR e colaboradores (1992), o estado fisiológico das células no biofilme é heterogêneo e é determinado pelo local onde cada célula se encontra nas múltiplas camadas celulares que formam o biofilme. Células mais próximas à superfície do biofilme encontrar-se-iam metabolicamente ativas e em tamanho normal, já que teriam fácil acesso a nutrientes, incluindo oxigênio, e teriam poucos problemas com produtos residuais de metabolismo celular. Em contraste, células bacterianas localizadas no interior da matriz polissacarídica seriam metabolicamente menos ativas devido ao pobre acesso a esses

nutrientes. Essas células também teriam problemas associados aos produtos residuais de metabolismo ao seu redor. Esse estado de dormência dificulta a ação dos antimicrobianos nas camadas mais profundas do biofilme.

Este é um dos mecanismos atualmente aceitos como responsável pela resistência bacteriana em biofilme. Outro mecanismo aceito é a dificuldade de alguns antimicrobianos se difundirem através da camada exopolissacarídica e polianiónica (ISHIDA et al., 1998) que envolve as bactérias. Além desses, ainda há a possibilidade da presença de uma subpopulação de bactérias denominadas persistentes, que estariam no estado de dormência e representariam menos de 1% (RAAD et al., 2007a).

Staphylococcus spp. tem mostrado resistência a múltiplos agentes antimicrobianos de uso clínico, dificultando o tratamento de infecções causadas por este gênero que compreende um grupo de espécies freqüentemente associadas a infecções nosocomiais ou adquiridas na comunidade, particularmente em pacientes com cateteres ou outros dispositivos médicos implantáveis (TENOVER et al., 1999).

Não apenas o gênero *Staphylococcus* tem apresentado múltipla resistência. Muitos estudos demonstram um significativo aumento na Concentração Inibitória Mínima em Biofilme (MBIC), quando comparada com a Concentração Inibitória Mínima (MIC), para diferentes antimicrobianos em várias espécies de microrganismos, como por exemplo, *Pseudomonas* spp. Discute-se que essa elevação na MBIC ocorreria devido aos mecanismos de resistência em biofilme já discutidos anteriormente (FRANK et al., 2007). Além disso, DUNNE (1990) relatou que doses sub-inibitórias de determinados antimicrobianos podem acentuar a formação de biofilme.

Éstá claro, portanto, que bactérias em biofilme são intrinsecamente mais resistentes aos agentes antimicrobianos que bactérias planctônicas (PATEL, 2005), pela dificuldade de difusão dos mesmos (SUCI et al., 1994). A concentração de antimicrobiano necessária para eliminar bactérias produtoras de biofilme é 100 a 1000 vezes maior que a necessária para eliminar as mesmas espécies em estado planctônico (FRANK & PATEL, 2007). Assim, é questionável o fato da suscetibilidade de microrganismos ainda ser testada apenas em crescimento planctônico (DUNNE, 2002; LINARES et al., 2006).

Segundo PINTO (2008), uma possível causa da dificuldade de difusão de alguns antimicrobianos usados na clínica seriam características físico-químicas apresentadas pelos diferentes antimicrobianos, que dificultariam a passagem da molécula do fármaco pela matriz do biofilme. Nesse trabalho, essas características estariam relacionadas com a polaridade da molécula em pH fisiológico. Outras propriedades também poderiam facilitar a penetração do fármaco no biofilme (ZHENG & STEWART, 2002).

DUNNE e colaboradores (1993) demonstraram que alguns antimicrobianos quando usados isoladamente em infecções relacionadas com biofilme podem estimular o desenvolvimento de resistência àquele fármaco. Adicionalmente, esse estudo também demonstrou que o uso concomitante de determinados antimicrobianos (rifampicina e vancomicina) pode melhorar a ação dos fármacos em questão, concluindo que um antimicrobiano poderia facilitar a penetração do outro resultando em um sinergismo de resultados.

O sucesso inconsistente da terapia com antimicrobianos em infecções associadas a dispositivos intravenosos pode refletir uma penetração deficiente através da matriz do biofilme (SCHADOW et al., 1988).

Neste contexto, fica evidente a necessidade de mais estudos que determinem quais os antimicrobianos mais adequados para uso quando a infecção envolve microrganismos produtores de biofilme. Além disso, tendo em vista a carência de estudos físico-químicos indicativos da causa do insucesso do agente antibacteriano frente ao biofilme, também fica clara a necessidade de mais pesquisas nesse âmbito.

1.1 Objetivos

- 1- Determinar quais antimicrobianos são mais adequados *in vitro* quando a infecção estiver relacionada com microrganismos produtores de biofilme.
- 2- Determinar quais as propriedades físico-químicas que estão diretamente relacionadas à penetração do antimicrobiano na matriz do biofilme.

2.1 Staphylococcus spp. e Biofilme

Dispositivos intravasculares são freqüentemente colonizados por bactérias formadoras de biofilme, o que pode ser demonstrado por microscopia eletrônica direta; a aderência instantânea não específica dos microrganismos às superfícies desses instrumentos pode ser claramente observada em laboratório (ANWAR et al., 1990). As fontes potenciais de bactérias, que estão mais associadas a esse tipo de infecção, têm sido bastante discutidas. Análises microbiológicas demonstraram que bactérias da microbiota da pele dos pacientes e da equipe médica, como *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidermidis*, estão comumente presentes (ANWAR et al., 1990).

As propriedades físico-químicas da superfície do cateter venoso central (CVC) podem exercer importante influência sobre a adesão dos microrganismos, os quais aderem mais facilmente às superfícies hidrofóbicas (plásticos) do que às hidrofílicas (vidro ou metais). Já foi demonstrado que a adesão microbiana melhora com o aumento da hidrofobicidade (DONLAN e COSTERTON, 2002).

Materiais como polietileno e polivinil, muitas vezes usados como principal constituinte dos CVC, favorecem a aderência de microrganismos (ROSS, 2006). Uma vez aderidos, *Staphylococcus* spp. proliferam formando múltiplas camadas que resultam em biofilme, o qual atua como barreira para os antimicrobianos, anticorpos, neutrófilos e macrófagos (DUNNE, 2002).

Nos últimos 10 anos muitos pesquisadores estudaram a formação de biofilme e suas implicações clínicas, mas os laboratórios clínicos pouco conhecem sobre a atividade dos antimicrobianos frente a esta forma de crescimento. MONZÓN e colaboradores (2001) estudaram o efeito bactericida *in*

vitro em *S. epidermidis* produtor e não produtor de biofilme. Eles observaram que eritromicina, rifampicina e tetraciclina apresentaram um efeito maior que vancomicina, clindamicina, cefalotina, teicoplanina e ofloxacino em isolados clínicos de *S. epidermidis* produtores de biofilme. Outro estudo salientou a relevância do teste de suscetibilidade na presença de biofilme e o potencial dano do uso indiscriminado da monoterapia com vancomicina, inadequada frente às infecções envolvendo microrganismos produtores de biofilme (AMORENA et al. 1999).

Além disso, PRESTERL e colaboradores (2009) concluíram que células bacterianas de *S. epidermidis* em biofilme apresentam resistência muito maior aos antimicrobianos, mesmo quando a concentração inibitória mínima é muito baixa. Estudaram também o uso combinado de azitromicina com tigeciclina, fosfomicina ou ceftriaxona em elevadas concentrações e concluíram que mesmo em altas concentrações o efeito sobre o biofilme é pequeno. A combinação de azitromicina numa concentração de 512 µg/ml com altas concentrações de ceftriaxona teve efeito bactericida significativo, nesse estudo.

Segundo OTTO (2009), somando-se à resistência à meticilina, cepas de *S. epidermidis* estão adquirindo resistência a inúmeros outros antimicrobianos, incluindo rifamicina, fluorquinolonas, gentamicina, tetraciclina, cloranfenicol, eritromicina, clindamicina e sulfonamidas. Além dessas, também é observada resistência a estreptograminas, linezolida e tigeciclina, porém mais raramente. Apesar de a resistência à meticilina e a outros antimicrobianos estar amplamente disseminada, 80% dos cateteres infectados com *S. epidermidis* podem ainda ser tratados com antimicrobianos como a vancomicina, sem a remoção do cateter (RAAD et al., 2007b). No entanto, resistência intermediária à vancomicina já foi

descrita e a formação de biofilme por *Staphylococcus* spp. diminui significativamente a atividade da vancomicina e de outros antimicrobianos (OTTO, 2009).

2.2 *Pseudomonas aeruginosa* e Biofilme

Pseudomonas aeruginosa é um dos principais agentes de infecções nosocomiais e tem grande importância clínica devido às elevadas taxas de morbi-mortalidade (QUINN, 2003). Além de causar diversos tipos de infecções, tem implicações de mau prognóstico em infecções do trato respiratório, tais como pneumonias associadas à ventilação mecânica, mas principalmente entre os pacientes portadores de fibrose cística (SINGH et al., 2000). A grande complexidade de mecanismos envolvidos torna o assunto ainda pouco elucidado e de grande importância clínica e laboratorial para o desenvolvimento de novos recursos na prática terapêutica (KIRISITS et al., 2005).

A habilidade de formar biofilmes é um fator crucial em infecções fatais por *Pseudomonas aeruginosa* e tem feito desta bactéria um organismo modelo em relação à formação de biofilme. Durante a colonização crônica, este microrganismo realiza a conversão do fenótipo não-mucóide para mucóide. A principal característica do fenótipo mucóide é a secreção de grande quantidade de exopolissacarídeos extracelulares altamente viscosos (STAPPER et al., 2004). O copolímero alginato, que é composto de manuronato e guluronato, aparece como o maior componente do polissacarídeo secretado e, além de ácidos nucléicos e proteínas, é o principal fator no desenvolvimento de biofilme mucóide. Infecções por produtores de alginato, em pacientes com fibrose cística,

têm sido associadas com super ativação da resposta imune e piora da condição clínica, sugerindo que a produção deste copolímero é um fator de virulência (Hentzer et al., 2001).

A produção de biofilme por *Pseudomonas aeruginosa* tem mostrado aumentar a resistência de colonização da doença pulmonar, fibrose cística, e conferir diversas vantagens à célula microbiana bem como altos níveis de resistência aos antimicrobianos e à ação letal aos leucócitos. A formação de matriz de substâncias extrapoliméricas tem papel importante no estabelecimento de um biofilme sustentável (HENTZER et al., 2001).

Além disso, a *Pseudomonas aeruginosa* apresenta resistência intrínseca a diversos antimicrobianos, sendo, caracteristicamente, menos susceptível que as Enterobactérias à maioria dos antimicrobianos (LIVERMORE, 2001). Os principais mecanismos de resistência deste microrganismo são: sistema de efluxo a muitas classes de antimicrobianos; perda de porina, que consiste em um canal para a entrada do fármaco, levando à redução na absorção do antimicrobiano; expressão de enzimas, como AmpC, betalactamases de espectro estendido (ESBL), metaloenzimas, entre outras.

2.3 Antimicrobianos

De todos os fármacos, os antimicrobianos estão entre os mais comumente prescritos e também utilizados de modo incorreto. A consequência inevitável do uso disseminado desses agentes terapêuticos foi o aparecimento de patógenos resistentes, levando à necessidade cada vez maior de novos fármacos. Entretanto, o ritmo de desenvolvimento de antimicrobianos diminuiu

drasticamente, com a introdução de um pequeno número de novos fármacos anualmente na prática clínica, dos quais poucos são realmente novos (BRUNTON et al., 2006).

Segundo BRUNTON e colaboradores (2006), os antimicrobianos são classificados com base na estrutura química e no mecanismo de ação proposto:

- ✚ Agentes que inibem a síntese da parede celular bacteriana, incluindo a classe dos betalactâmicos (por ex.: penicilinas, cefalosporinas e carbapenemas) e agentes distintos como ciclosserina, vancomicina e bacitracina;
- ✚ Agentes que atuam diretamente sobre a membrana celular do microrganismo, aumentando a sua permeabilidade e resultando no extravasamento de compostos intracelulares, incluindo a polimixina; agentes antifúngicos poliênicos (por ex.: nistatina e anfotericina B) que se ligam aos esteróis de parede celular; e o lipopeptídeo daptomicina;
- ✚ Agentes que afetam a função das subunidades ribossômicas 30S ou 50S, causando inibição reversível da síntese de proteínas, que são geralmente bacteriostáticos (por ex.: cloranfenicol, tetraciclina, eritromicina, clindamicina, estreptograminas e linezolida);
- ✚ Agentes que se ligam à subunidade ribossômica 30S e alteram a síntese de proteínas, geralmente bactericidas (por ex.: aminoglicosídeos);
- ✚ Agentes que afetam o metabolismo bacteriano dos ácidos nucleicos, como as rifamicinas (por ex.: rifampicina e rifabutina), que inibem a RNA-polimerase, e as quinolonas, que inibem as topoisomerasas;
- ✚ Os antimetabólitos, como trimetoprima, e as sulfonamidas, que bloqueiam enzimas essenciais do metabolismo do folato.

2.4 Antimicrobianos e Resistência

A resistência aos antimicrobianos é um problema que vem aumentando com o passar dos anos. Ela pode ser natural (intrínseca) ou adquirida, e alguns exemplos de mecanismos de resistência estão resumidos na tabela 1.

Outro conhecido mecanismo de resistência aos antimicrobianos conhecido é produção de biofilme, uma estratégia de defesa bastante eficaz (PATEL, 2005).

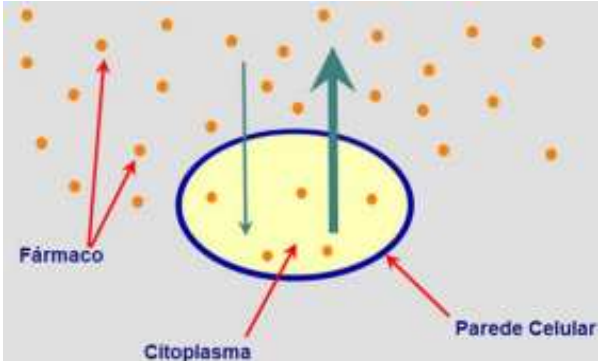
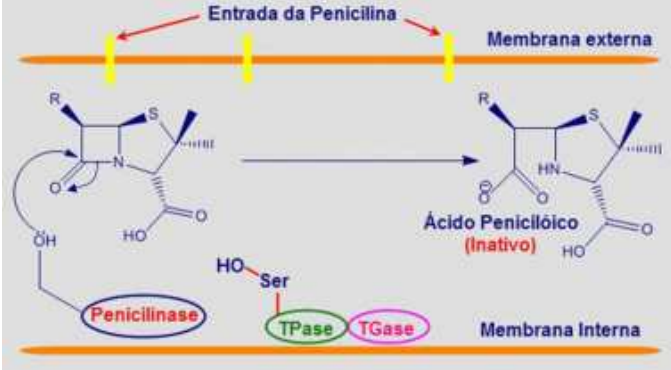
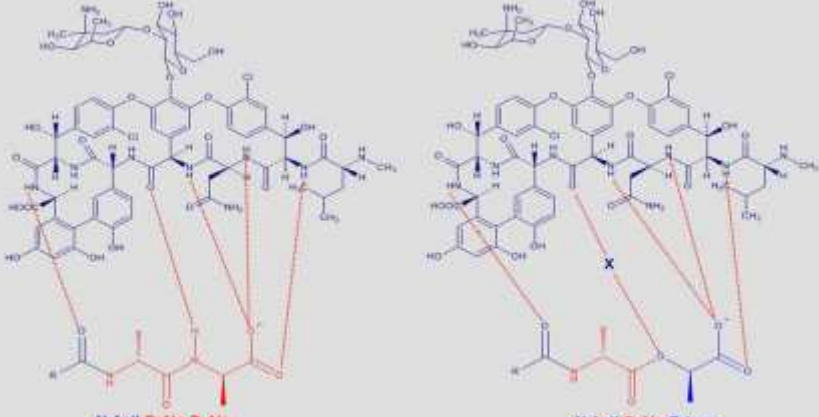
<p>Bomba de Efluxo (Tetraciclina, macrolídeos)</p>	
<p>Enzimas Inativadoras Ex.: β-lactamases, acetil-transferases (β-lactâmicos, aminoglicosídeos)</p>	
<p>Modificação da Enzima Alvo (Vancomicina)</p>	

Tabela 1: Alguns Mecanismos de Resistência e seus exemplos (adaptado de WRIGHT, 2007, HANCOCK, 2005 e AFONSO, 2008.)

2.5 Antimicrobianos e Biofilme

Aminoglicosídeos, macrolídeos, quinolonas e rifampicina

Os inibidores da síntese protéica e as fluorquinolonas são extensamente estudados *in vitro* e *in vivo* no controle de infecções relacionadas a biofilme. Os

aminoglicosídeos são rotineiramente usados no tratamento de pacientes com fibrose cística e condições similares. O efeito benéfico dos aminoglicosídeos em infecções relacionadas a biofilme parece estar relacionado à sua capacidade de reduzir a quantidade de microrganismos pelo seu efeito bactericida. No entanto, esses fármacos não são tão efetivos quanto outros inibidores da síntese protéica nessa situação (em biofilme) (PACE et al., 2006).

Os macrolídeos parecem ter duplo efeito em infecções relacionadas a biofilme, mas esses efeitos são distintos de sua atividade antibacteriana. Esses fármacos inibem a produção de componentes do biofilme por bactérias gram-negativas e podem produzir um efeito antiinflamatório. Linezolid e quinupristina / dalfopristina são os mais novos inibidores da síntese protéica e parecem promissores para infecções relacionadas a biofilme, baseado em observações *in vitro*. Estudos clínicos são necessários para validar esses achados (PACE et al., 2006).

As fluorquinolonas, assim como os aminoglicosídeos, são comumente usadas em infecções relacionadas a biofilme para reduzir a carga bacteriana, e podem ser mais efetivos, nesse caso, devido à maior penetração na matriz do biofilme. Terapia crônica supressiva com ciprofloxacino oral tem se tornado parte da rotina terapêutica para o manejo de fibrose cística (PACE et al., 2006).

Finalmente, a rifampicina exerce efeito bactericida sinérgico em combinação com vários agentes contra bactérias gram-positivas e gram-negativas. Essa atividade, juntamente com uma excelente penetração intracelular, faz da rifampicina um agente potencialmente valioso para o manejo de infecções relacionadas a biofilme (PACE et al., 2006).

Betalactâmicos

Enquanto algumas pesquisas têm examinado diretamente o impacto de antimicrobianos betalactâmicos na formação de biofilme e na destruição deste, outros estudos descrevem a eficácia desses antibacterianos contra infecções relacionadas ao biofilme. Com um maior conhecimento da biologia do biofilme e das doenças relacionadas a ele, maiores oportunidades para intervenção com antimicrobianos betalactâmicos poderão ser encontradas, especialmente com o desenvolvimento de novos agentes ou novas fórmulas especificamente “desenhadas” para tratar o biofilme já estabelecido. São necessárias pesquisas mais específicas sobre o impacto dos betalactâmicos sobre sua estrutura e função, assim como sobre a eficácia desses antimicrobianos, bem como seu uso em terapias combinadas. Combinações de diferentes classes de agentes antimicrobianos podem fornecer uma aproximação efetiva desse fenômeno microbiológico de difícil tratamento. O surgimento de altos índices de resistência a múltiplas classes de antimicrobianos em espécies bacterianas formadoras de biofilme, bem como a resistência intrínseca conferida por este, ressalta a necessidade de novos agentes e novas estratégias para enfrentar este problema (PACE et al., 2006).

Glicopeptídeos

O uso de dispositivos médicos provavelmente continuará a crescer na próxima década, devido a inúmeros fatores, e também seu papel prevalente no tratamento de uma variedade de doenças. Infecções relacionadas a bactérias

formadoras de biofilme irão necessariamente aumentar. Experimentos sugerem que a prevalência de isolados de *Staphylococcus aureus* resistentes a vancomicina (VRSA) aumentará. Essa é uma grande preocupação, particularmente pela sua multirresistência, associada com doenças relacionadas a dispositivos médicos e reduzidos esforços industriais para a criação de novos antimicrobianos. O importante papel dos glicopeptídicos, e particularmente da vancomicina, é provável que continue no futuro próximo (PACE et al., 2006).

2.6 Propriedades Físico-Químicas e Farmacológicas dos Antimicrobianos

As principais propriedades físico-químicas de uma molécula capazes de alterar seu perfil farmacoterapêutico são o coeficiente de partição ($\log P$), que expressa a lipofilia da molécula, e o grau de ionização, expresso pelo pK_a , que traduz o grau de contribuição relativa das espécies neutra e ionizada em determinado pH (BARREIRO & FRAGA, 2008).

A lipofilia é definida pelo coeficiente de partição de uma substância entre uma fase aquosa e uma fase orgânica. O conceito atualmente aceito para coeficiente de partição pode ser definido pela razão entre a concentração na fase orgânica e sua concentração na fase aquosa em um sistema de dois compartimentos sob condições de equilíbrio. Os fármacos que apresentam maior coeficiente de partição, ou seja, têm maior afinidade pela fase orgânica, tendem a ultrapassar com maior facilidade as biomembranas hidrofóbicas, apresentando melhor perfil de biodisponibilidade, que pode refletir em um melhor perfil farmacológico (BARREIRO & FRAGA, 2008).

Sulfonamidas

As sulfonamidas exibem ampla faixa de atividade antimicrobiana frente bactérias tanto gram-positivas quanto gram-negativas. Entretanto, as cepas resistentes tornaram-se comuns, de modo que a utilidade desses fármacos declinou. Em geral as sulfonamidas só exercem efeito bacteriostático, e os mecanismos de defesa celular e humoral do hospedeiro são essenciais para a erradicação final da infecção (BRUNTON et al., 2006).

As sulfonamidas são inibidores competitivos da diidropteroato sintase, enzima bacteriana responsável pela incorporação do PABA (ácido *para*-aminobenzóico) no ácido diidropteróico, o precursor imediato do ácido fólico. A trimetoprima, outro antimicrobiano, exerce efeito sinérgico quando utilizado com uma sulfonamida. Trata-se de um poderoso inibidor competitivo seletivo da diidrofolato redutase microbiana, enzima que reduz o diidrofolato a tetraidrofolato. A administração simultânea de sulfonamida e trimetoprima introduz bloqueios seqüenciais na via de síntese do tetraidrofolato dos microrganismos (BRUNTON et al., 2006).

Ex.: *SULFAMETOXAZOL* (fig. 1)

$C_{10}H_{11}N_3O_3S = 253,3$

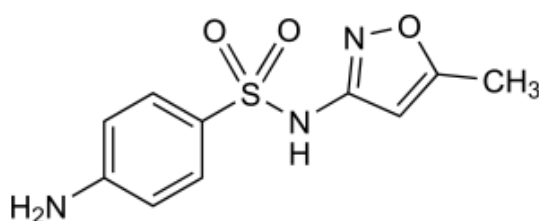


Figura 1: Sulfametoxazol

Ligeiramente solúvel em água. Solúvel 1 parte para 50 de etanol e 1 para 3 de acetona. Praticamente insolúvel em clorofórmio e éter. Solúvel em soluções alcalinas (MOFFAT et al., 2003).

Coeficiente de Partição: Log *P* (octanol/água): 0,9.

EX.: *TRIMETOPRIMA* (fig. 2)

$C_{14}H_{18}N_4O_3=290,3$

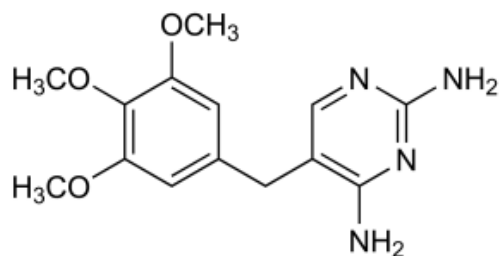


Figura 2: Trimetoprima

Solúvel 1 parte para 2500 de água, 1 para 300 de etanol, 1 para 55 de clorofórmio e 1 para 80 de metanol. Praticamente insolúvel em éter (MOFFAT et al., 2003).

Coeficiente de Partição: Log *P* (octanol/água): 0,91.

Betalactâmicos

Os antimicrobianos betalactâmicos incluem as penicilinas, que apresentam atividade contra cocos gram-positivos. Também incluem as cefalosporinas, que são classificadas pela geração (1^a geração: excelente atividade contra gram-positivos e atividade modesta contra gram-negativos; 2^a geração: apresentam atividade um pouco melhor contra gram-negativos e incluem algumas cefalosporinas com atividade sobre microrganismos anaeróbicos; 3^a geração: atividade frente gram-positivos e atividade muito maior contra Enterobacteriaceae, com um subgrupo ativo contra *Pseudomonas*

aeruginosa; 4ª geração: apresentam o espectro antimicrobiano dos agentes da 3ª geração, com aumento da estabilidade à hidrólise por betalactamases (BRUNTON et al., 2006).

Essa classe de antimicrobianos atua inibindo a síntese da parede celular bacteriana.

Ex.: METICILINA (fig. 3)

$C_{17}H_{20}N_2O_6S = 380,4$

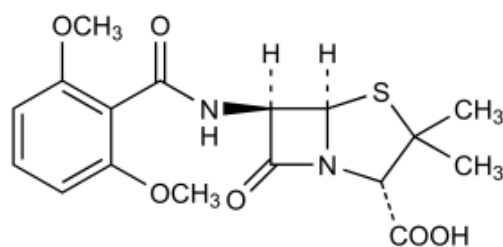


Figura 3: Meticilina

Coeficiente de Partição: Log *P* (octanol/água): 1,2.

Ex.: AMOXICILINA (fig. 4)

$C_{16}H_{19}N_3O_5S = 365,4$

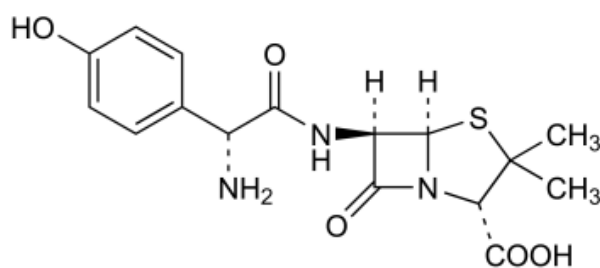


Figura 4: Amoxicilina

Solúvel 1 parte para menos de 1 de água (MOFFAT et al., 2003).

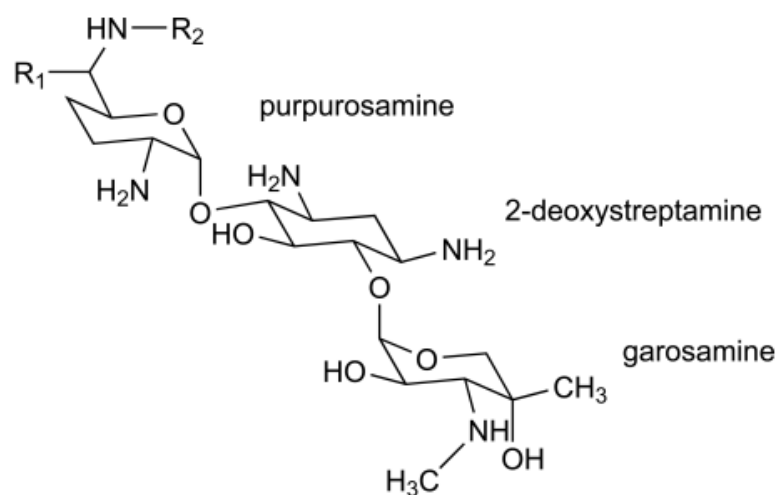
Coeficiente de Partição: Log *P* (octanol/água): 0,87.

Aminoglicosídeos

O grupo dos aminoglicosídeos inclui a gentamicina, tobramicina, amicacina, canamicina, estreptomicina e neomicina. Esses fármacos são utilizados principalmente no tratamento de infecções causadas por bactérias gram-negativas. Em contraste com a maioria dos inibidores da síntese microbiana de proteínas, que são bacteriostáticos, os aminoglicosídeos são inibidores bactericidas da síntese protéica (BRUNTON et al., 2006).

Ex.: GENTAMICINA (fig. 5)

$C_{21}H_{43}N_5O_7 = 477,6$



Gentamicin C₁ R₁ = R₂ = CH₃
Gentamicin C₂ R₁ = CH₃, R₂ = H
Gentamicin C_{1a} R₁ = R₂ = H

Figura 5: Gentamicina

Facilmente solúvel em água, solúvel em piridina. Moderadamente solúvel em metanol, etanol e acetona. Parcialmente solúvel em clorofórmio. Praticamente insolúvel em benzeno e hidrocarbonetos halogenados (MOFFAT et al., 2003).

Coeficiente de Partição: Log P (octanol/água): -1,9.

Tetraciclínas

As tetraciclínas são antimicrobianos bacteriostáticos com atividade contra ampla variedade de bactérias gram-positivas e gram-negativas, aeróbicas e anaeróbicas. Dentre as tetraciclínas, a minociclina e a doxiciclina são os fármacos mais lipofílicos (BRUNTON et al., 2006).

Essa classe de antimicrobianos inibe a síntese de proteínas bacterianas através de sua ligação ao ribossomo bacteriano 30S, impedindo o acesso do aminoacil-tRNA ao local acceptor no complexo mRNA-ribossomo (BRUNTON et al., 2006).

Ex.: *DOXICICLINA* (fig. 6)

$C_{22}H_{24}N_2O_8 \cdot H_2O = 462,5$

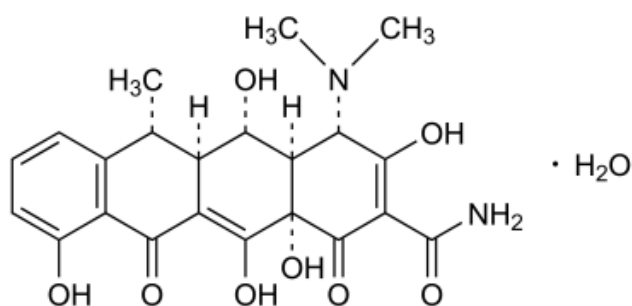


Figura 6: Doxiciclina

Ligeiramente solúvel em água, parcialmente solúvel em etanol, praticamente insolúvel em clorofórmio e éter. Facilmente solúvel em ácidos diluídos e álcalis (MOFFAT et al., 2003).

Coeficiente de Partição: Log P (octanol/água): -0,2.

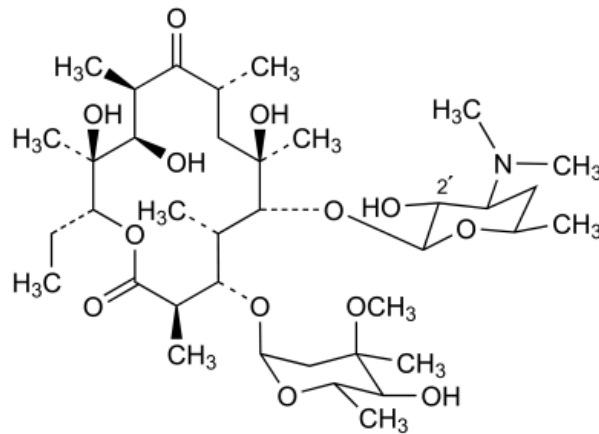


Figura 8: Eritromicina

Solúvel 1 parte para 1000 de água. Menos solúvel a altas temperaturas.
 Solúvel 1 parte para 5 de etanol. Facilmente solúvel em acetona, clorofórmio, acetonitrila e acetato de etila. Moderadamente solúvel em éter, dicloro etileno (MOFFAT et al., 2003).

Coefficiente de Partição: Log *P* (octanol/água): 3,06.

EX.: AZITROMICINA (fig. 9)

$C_{38}H_{72}N_2O_{12} = 749,0$

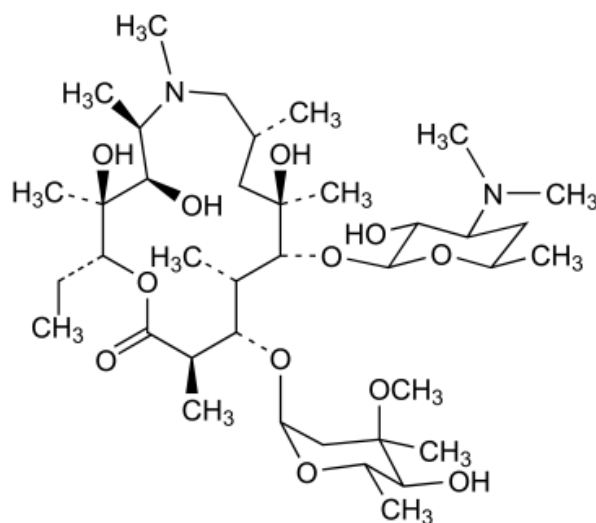


Figura 9: Azitromicina

Coeficiente de Partição: Log *P* (octanol/água): 4,02.

RIFAMPICINA (fig. 10)

É um macrolídeo complexo que inibe o crescimento da maioria das bactérias gram-positivas e muitas gram-negativas. Age inibindo a RNA-polimerase DNA-dependente das micobactérias e de outros microrganismos através da formação de um complexo farmacoenzimático estável, levando à supressão da iniciação da formação da cadeia na síntese de RNA (BRUNTON et al., 2006).

$C_{43}H_{58}N_4O_{12} = 822,9$

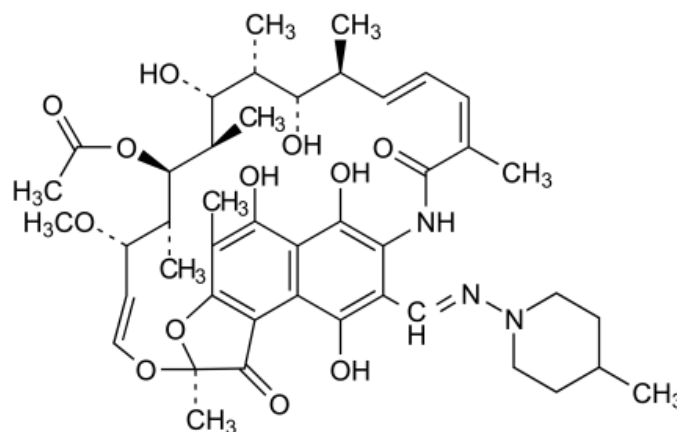


Figura 10: Rifampicina

Ligeiramente solúvel em água, etanol, acetona e éter. Facilmente solúvel em clorofórmio. Solúvel em acetato de etila e metanol (MOFFAT et al., 2003).

Coeficiente de Partição: Log *P* (octanol/água): 4,2.

Lincosaminas

Ex.: *CLINDAMICINA* (fig.11)

A clindamicina liga-se exclusivamente à subunidade 50S dos ribossomos bacterianos e suprime a síntese de proteínas. Embora a clindamicina, eritromicina e cloranfenicol não sejam estruturalmente relacionados, todos os três atuam em locais muito próximos, e a ligação de um desses antimicrobianos aos ribossomos pode inibir a ligação dos outros (BRUNTON et al., 2006).

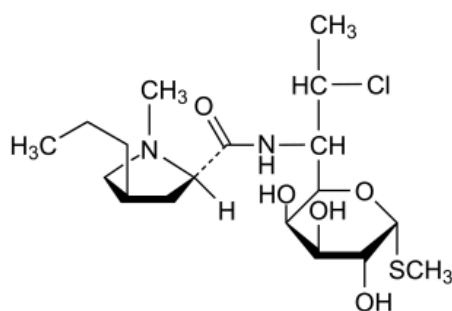


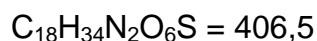
Figura 11: Clindamicina

É solúvel 1 parte para 2 de água e 1 para 200 de etanol. Facilmente solúvel em metanol e pouco solúvel em clorofórmio (MOFFAT et al., 2003).

Coeficiente de Partição: Log *P* (octanol/água): 1,6.

EX.: *LINCOMICINA* (fig. 12)

A lincomicina é um antimicrobiano que apresenta atividade bacteriostática por bloqueio da síntese protéica bacteriana ao interferir na transpeptidação da subunidade ribossômica 50S (BRUNTON et al., 2006).



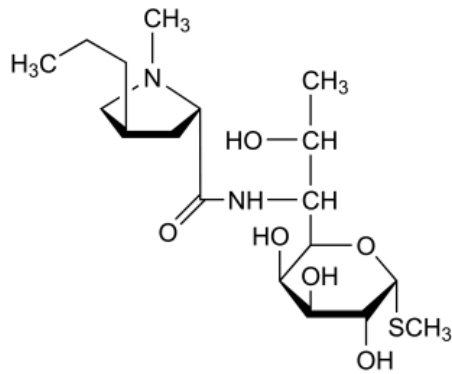


Figura 12: Lincomicina

Ligeiramente solúvel em água. Solúvel em metanol, acetato de etila, acetona e clorofórmio (MOFFAT et al., 2003).

Coeficiente de Partição: Log *P* (octanol/água): 0,6.

Glicopeptídeos

A vancomicina, principal representante, inibe a síntese da parede celular das bactérias através de ligação de alta afinidade à extremidade D-alanil-D-alanina de unidades precursoras da parede celular (BRUNTON et al., 2006).

Ex.: *VANCOMICINA* (fig. 13)

$C_{66}H_{75}Cl_2N_9O_{24} = 1449,3$

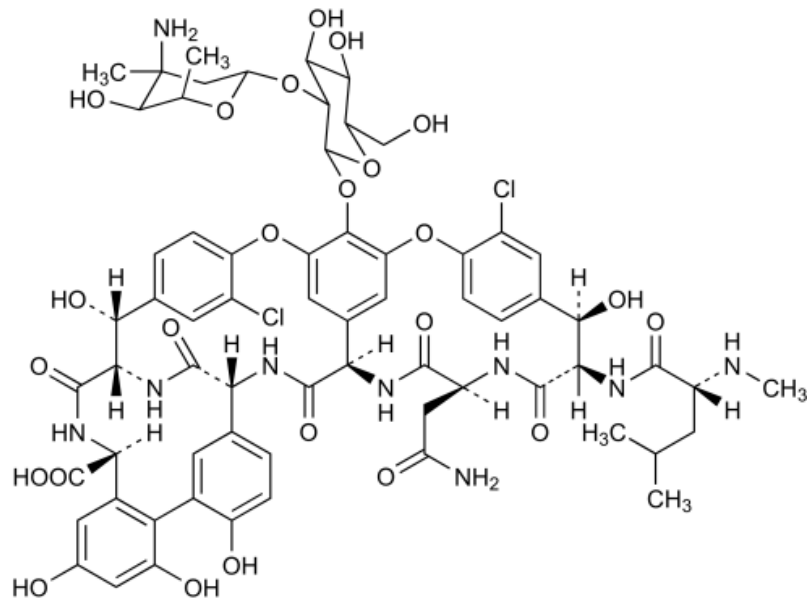


Figura 13: Vancomicina

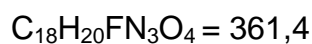
Solúvel 1 parte para 10 de água. Moderadamente solúvel em metanol diluído. Insolúvel em acetona, éter (MOFFAT et al., 2003).

Coefficiente de Partição: Log *P* (octanol/água): -3,1.

Quinolonas

As quinolonas têm como alvo a DNA girase e a topoisomerase IV bacterianas. Para muitas bactérias gram-positivas, a topoisomerase IV é a atividade principal inibida por essa classe de fármacos. Já para bactérias gram-negativas, o principal alvo é a DNA girase (BRUNTON et al., 2006).

Ex.: *LEVOFLOXACINO* (fig. 14)



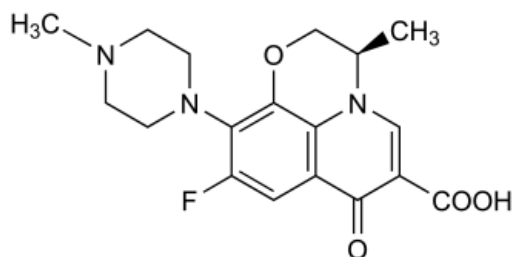


Figura 14: Levofloxacino

Facilmente solúvel em ácido acético glacial e clorofórmio. Parcialmente solúvel em água (MOFFAT et al., 2003).

Coeficiente de Partição: Log *P* (octanol/água): 0,84.

EX.: CIPROFLOXACINO (fig. 15)

$C_{17}H_{18}FN_3O_3 = 331,4$

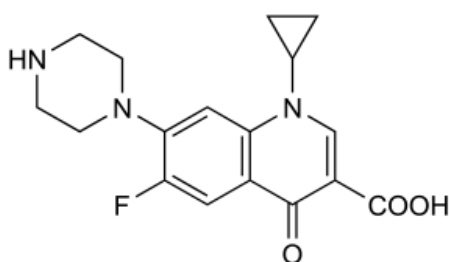


Figura 15: Ciprofloxacino

Praticamente insolúvel em água. Ligeiramente solúvel em etanol e diclorometano. Solúvel em ácido acético diluído (MOFFAT et al., 2003).

Coeficiente de Partição: Log *P* (octanol/água): 0,28.

Outros

Ex.: CLORANFENICOL (fig. 16)

Esse fármaco inibe a síntese de proteínas nas bactérias. Atua primariamente através da ligação reversível à subunidade ribossômica 50S (próximo ao local de ligação dos macrolídeos e clindamicina, que são inibidos competitivamente pelo cloranfenicol) (BRUNTON et al., 2006).

$C_{11}H_{12}Cl_2N_2O_5 = 323,1$

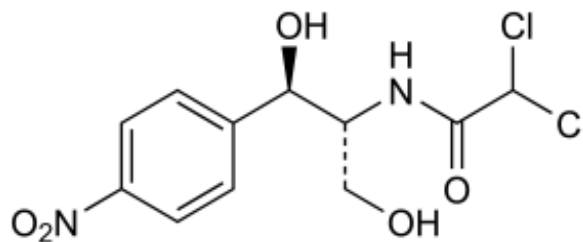


Figura 16: Cloranfenicol

Solúvel 1 parte para 400 de água e 1 para 2,5 de etanol. Muito solúvel em acetona e acetato de etila. Ligeiramente solúvel em clorofórmio e éter (MOFFAT et al., 2003).

Coeficiente de Partição: Log *P* (octanol/água): 0,7.

2.7 Outros Agentes contra Biofilme

Outros agentes, não classificados como antimicrobianos, têm sido testados no combate ao biofilme. Um deles, já bastante conhecido, é o EDTA (ácido etilenodiamino tetracético, atualmente, oficialmente chamado de ácido edético) (figura 17), que tem sido estudado sozinho ou em combinações. Essa substância é conhecida por suas propriedades quelantes, e tem ação contra bactérias gram-positivas e gram-negativas, removendo cálcio, magnésio e ferro

da membrana celular, causando lesão nesta membrana (KITE et al., 2004; BLEYER et al., 2005). Outro mecanismo discutido para esta molécula é a possibilidade dela formar juntamente com o ferro (ou quelatos similares) uma nuclease química, capaz de lesar o DNA do microorganismo (SIGMAN, 1990).

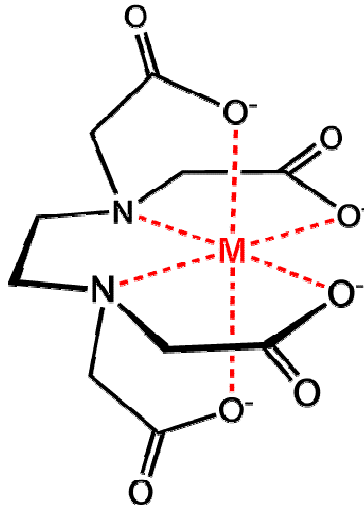


Figura 17: Quelato Metal-EDTA

Apesar de não ser um antimicrobiano, o EDTA parece comprometer a estrutura do biofilme (RAAD et al., 1997). PERCIVAL e colaboradores (2005) mostraram a erradicação do biofilme, *in vitro*, em cateteres de hemodiálise com o uso de 40 mg/ml de EDTA. Outros autores também encontraram resultados promissores com o uso de EDTA em combinação com minociclina, tanto para biofilme bacteriano quanto para fúngico (RAAD et al., 2003). Porém poucos estudos são encontrados com uso do EDTA na prevenção da formação de biofilme.

3 PARTE 1

AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA DE VANCOMICINA, RIFAMPICINA, GENTAMICINA, AZITROMICINA, ERITROMICINA, CLARITROMICINA, CLINDAMICINA, DOXICICLINA, LEVOFLOXACINO E CLORANFENICOL EM BIOFIME DE *STAPHYLOCOCCUS EPIDERMIDIS*

AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA DE VANCOMICINA, RIFAMPICINA, GENTAMICINA, AZITROMICINA, ERITROMICINA, CLARITROMICINA, CLINDAMICINA, DOXICICLINA, LEVOFLOXACINO E CLORANFENICOL EM BIOFILME DE *STAPHYLOCOCCUS EPIDERMIDIS*

Camille Catani Ferreira Pinto¹, Ana Lúcia Souza Antunes¹, Pedro Eduardo Fröhlich¹

¹Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brasil.

Resumo

A terapêutica antimicrobiana em infecções envolvendo microrganismos produtores de biofilme está bastante relacionada ao insucesso. Muitos autores mostram a grande diferença entre a concentração inibitória mínima em células planctônicas (MIC) e em biofilme (MBIC). Por isso decidimos avaliar quais antimicrobianos mantêm sua ação em matriz polissacarídica e quais são ineficientes. Avaliamos, também, quais antimicrobianos eram capazes de estimular a produção de *slime* em concentrações subinibitórias.

Através de métodos já padronizados e do método colorimétrico com cristal violeta estabelecemos os valores de MIC e MBIC para *Staphylococcus epidermidis* fortemente produtores de biofilme.

Os antimicrobianos que apresentaram menor diferença entre MIC e MBIC foram a rifampicina e os macrolídeos (azitromicina, claritromicina e eritromicina), enquanto os que apresentaram os resultados mais contundentes (com diferença de até 4000 vezes entre MIC e MBIC) foram vancomicina e clindamicina. Levofloxacino, cloranfenicol, doxiciclina e gentamicina apresentaram resultados

intermediários, sendo que vancomicina e gentamicina foram capazes de estimular a produção de biofilme em concentrações subinibitórias.

Palavras-chave: biofilme, macrolídeos, rifampicina, vancomicina, levofloxacino, cloranfenicol, gentamicina, doxiciclina, clindamicina.

4 PARTE 2

**AVALIAÇÃO DE PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS DOS ANTIMICROBIANOS QUE PODEM
ESTAR ENVOLVIDAS NA SUA PENETRAÇÃO E EFICÁCIA EM BIOFILME DE
*STAPHYLOCOCCUS EPIDERMIDIS***

AVALIAÇÃO DE PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS DOS ANTIMICROBIANOS QUE PODEM ESTAR ENVOLVIDAS NA SUA PENETRAÇÃO E EFICÁCIA EM BIOFILME DE *STAPHYLOCOCCUS EPIDERMIDIS*

Camille Catani Ferreira Pinto¹, Ana Lúcia Souza Antunes¹, Pedro Eduardo Fröhlich¹

¹Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brasil.

Resumo

Poucos estudos têm tentado explicar o porquê da falha terapêutica dos antimicrobianos em infecções relacionadas a *Staphylococcus* spp. produtores de biofilme. Por isso, este trabalho tem por objetivo esclarecer algumas prováveis causas da falha de penetração do fármaco em biofilme. Para isso, foi estabelecida a concentração inibitória mínima em células planctônicas e em biofilme por método já padronizado e pelo método colorimétrico do cristal violeta, respectivamente. Foi gerada, então, uma razão para cada antimicrobiano (rifampicina, azitromicina, claritromicina, eritromicina, levofloxacino, doxiciclina, gentamicina, cloranfenicol, clindamicina e vancomicina) a fim de avaliar a diferença entre MIC e MBIC. Esta razão foi comparada a diversas propriedades físico-químicas dos fármacos estudados.

Das propriedades avaliadas, a área polar da molécula, a lipofilia (log P), a complexidade molecular e a massa molar mostraram correlação com a razão MBIC/MIC, parecendo interferir na penetração do antimicrobiano em biofilme.

Palavras-chave: propriedades físico-químicas, biofilme, antimicrobianos,
Staphylococcus epidermidis

5 PARTE 3

**TRATAMENTO DE MICROPLACAS COM EDTA NA PREVENÇÃO DO DESENVOLVIMENTO DE
BIOFILME DE *STAPHYLOCOCCUS EPIDERMIDIS* E *PSEUDOMONAS AERUGINOSA***

TRATAMENTO DE MICROPLACAS COM EDTA NA PREVENÇÃO DO DESENVOLVIMENTO DE BIOFILME DE *STAPHYLOCOCCUS EPIDERMIDIS* E *PSEUDOMONAS AERUGINOSA*

Camille Catani Ferreira Pinto¹, Ana Lúcia Souza Antunes¹, Pedro Eduardo Fröhlich¹

¹Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brasil.

Resumo

Alguns trabalhos vêm mostrando o EDTA (ácido edético) como alternativa no tratamento do biofilme. No entanto, muito pouco se sabe sobre a sua eficácia na prevenção do desenvolvimento da matriz polissacarídica. Este trabalho avalia o uso do EDTA nesta prevenção. Para isso, foram utilizados *Staphylococcus* spp, *Pseudomonas aeruginosa* hospitalares e microplacas de polímero plástico tratadas com EDTA. Para as duas espécies bacterianas, o EDTA foi capaz de impedir a formação de biofilme, com absorvância comparável ao branco experimental.

Palavras-chave: EDTA, prevenção do biofilme, *Staphylococcus epidermidis*, *Pseudomonas aeruginosa*.

Neste trabalho foi avaliada a influência da formação de biofilme na ação de alguns antimicrobianos e quais propriedades físico-químicas estariam envolvidas na penetração do fármaco na matriz polissacarídica. Além disso, foram pesquisados os efeitos do EDTA em polímeros plásticos na prevenção da formação do biofilme.

A vancomicina é um antimicrobiano muito útil em infecções hospitalares causadas por MRSA (*Staphylococcus aureus* metilina resistente). Ainda poucos *Staphylococcus* spp. apresentam resistência a este fármaco (HIRAMATSU et al., 1997). No entanto, esta bactéria está intimamente ligada a infecções relacionadas a cateteres venosos (TENOVER et al., 1999), os quais costumam ser colonizados por microrganismos formadores de biofilme (GARLAND et al., 2005). Imersos na matriz polissacarídica, os antimicrobianos não costumam manter sua eficiência, apresentando MBIC até 1000 vezes superior à MIC (FRANK & PATEL, 2007). Neste trabalho, foi possível avaliar isto e mostrar que a vancomicina em biofilme apresentou o pior resultado dentre os 10 fármacos testados. Isto vem ratificar outros estudos (LAPLANTE & MERMEL, 2009) e mostrar a necessidade de atenção no uso deste medicamento em infecções relacionadas a microrganismos produtores de biofilme. Além da vancomicina, clindamicina, cloranfenicol, doxiciclina, gentamicina e levofloxacino também apresentaram razão MBIC/MIC elevada, parecendo ser pouco eficazes em biofilme.

Em nosso estudo, rifampicina, azitromicina, claritromicina e eritromicina obtiveram os melhores resultados em matriz polissacarídica, o que confirma alguns estudos (MONZON et al., 2002; PRESTERL et al., 2009). Esses fármacos parecem ser a melhor opção em infecções relacionadas a microrganismos susceptíveis a eles, mesmo na presença de biofilme. Quando comparamos a

MIC com a MBIC destes antimicrobianos, percebe-se baixa elevação na segunda em relação à primeira, o que é bastante expressivo quando lembramos que foram obtidas elevações de até 4000 vezes da MBIC em relação à MIC para alguns fármacos.

Apesar de os macrolídeos serem um grupo promissor de antimicrobianos, atualmente já existem muitos microrganismos resistentes a eles. Com MIC elevada fica muito difícil obter bons resultados terapêuticos, uma vez que as concentrações necessárias para eliminar bactérias em biofilme são ainda maiores que a MIC e se tornam tóxicas quando atingidas no plasma. Um fármaco que ainda apresenta MIC baixa e tem MBIC intermediária, de acordo com este trabalho, é a doxiciclina, o que seria uma alternativa bastante interessante na terapêutica.

Alguns trabalhos mostram que alguns antimicrobianos em doses subinibitórias são capazes de estimular a produção de biofilme (GAREY et al., 2009). Com base nisto, foi feito um estudo preliminar verificando esta capacidade para os fármacos testados. Apenas gentamicina e vancomicina foram capazes de estimular a produção de biofilme. Isso confirma resultados obtidos por BALOTESCU e colaboradores (2002), que mostraram que vancomicina estimulou a adesão e conseqüente formação de biofilme em alguns microrganismos. MARR e colaboradores (2007) também mostraram que a gentamicina é capaz de aumentar a formação de biofilme pela indução de genes envolvidos neste processo.

Mas porque certos antimicrobianos têm uma ação reduzida em biofilme? Nossos resultados apresentaram uma boa correlação ($r^2 = 0,83$) da MBIC/MIC com a área polar (AP) desses fármacos, mostrando piores resultados para os

que apresentavam maior AP. Isso significa que quanto maior a área polar da molécula, menor parece ser sua penetração em biofilme, justificando a falha destes antimicrobianos. Além disso, complexidade molecular e massa molar também mostram tendência de, com seus aumentos, reduzir a penetração na matriz polissacarídica, ou seja, moléculas maiores e mais complexas parecem apresentar mais dificuldade para penetrarem o biofilme. Porém, mais estudos devem ser realizados com um número maior de antimicrobianos.

Além destes fatores, o log P também foi avaliado e mostrou leve tendência ($r^2 = 0,63$) de aumentar juntamente com sua penetração no biofilme, sugerindo que características lipofílicas (elevado log P) facilitariam a penetração em biofilme. No entanto, se levarmos em consideração os seis fármacos que apresentaram melhor penetração, esta correlação deixa de ser fraca e passa a ser muito significativa ($r^2 = 0,96$), mostrando, neste grupo, forte influência de características lipofílicas na penetração em matriz polissacarídica.

Além disso, os quatro melhores antimicrobianos (rifampicina, azitromicina, claritromicina e eritromicina) apresentam características moleculares semelhantes: todos são macrociclos, o que parece ser interessante na penetração em biofilme. Tal fato também observado por FORREST e TAMURA (2010) que mostra a eficiência da rifampicina em biofilme. Outra peculiaridade deste grupo é uma boa correlação da MBIC/MIC com a solubilidade em água ($r^2 = 0,79$). Com isso, infere-se que, além de características lipofílicas, certa hidrossolubilidade é necessária para facilitar a penetração na matriz do biofilme, sem contudo apresentar elevada área polar.

Uma perspectiva atual bastante interessante e que, de certa forma, vem confirmar resultados obtidos neste estudo, é o uso de lipossomas para carrear

fármacos através do biofilme até seu alvo: o microrganismo. Estes carreadores têm potencial para serem utilizados tanto para moléculas lipofílicas quanto para hidrofílicas. BAKKER-WOUDENBERG e colaboradores (2002) mostraram a eficácia aumentada de ciprofloxacino lipossomal quando comparados ao mesmo fármaco livre em pneumonia causada por *Pseudomonas aeruginosa* produtora de biofilme. Outros estudos, também, mostraram eficiência aumentada para gentamicina quando na forma lipossomal (BAKKER-WOUDENBERG et al., 2000).

Com isso, é possível inferir que as características lipofílicas destes carreadores ajudam na penetração da matriz polissacarídica. Deste modo, moléculas com características hidrofílicas, que apresentam problemas na penetração do biofilme, poderiam se beneficiar das características do lipossoma, sendo uma alternativa no combate a microrganismos produtores de biofilme.

Um estudo paralelo foi realizado avaliando o uso do EDTA em polímeros plásticos e seu efeito na produção de biofilme. Placas tratadas previamente com esse agente não permitiram sua formação por *Staphylococcus epidermidise* *Pseudomonas aeruginosa*, apresentando leituras de densidade óptica comparáveis às leituras do branco. Diferente de outros autores (AL-BAKRI et al., 2009), o presente trabalho mostra o EDTA na profilaxia e não após o desenvolvimento do biofilme bacteriano.

6 CONCLUSÕES FINAIS

- Todos os antimicrobianos testados apresentaram MBIC superior à MIC.
- Doxíciclina foi o único antimicrobiano que apresentou MBIC baixas (até 16 $\mu\text{l} / \text{ml}$), compatíveis com níveis plasmáticos.
- Os antimicrobianos que apresentaram maior eficácia foram os macrolídeos (azitromicina, claritromicina e eritromicina) e a rifampicina.
- As características físico-químicas comuns aos fármacos de maior eficiência foram: log P, o qual apresentou relação direta com a penetração em biofilme; moderada solubilidade em água associada ao elevado log P; e características moleculares comuns a estes fármacos.
- O antimicrobiano que apresentou baixa efetividade – com uma relação MBIC/MIC, muito superior aos demais fármacos, foi a vancomicina. Isso foi atribuído ao seu baixo log P, a alta complexidade da molécula e sua elevada massa molar.
- O EDTA foi bastante eficaz na prevenção da formação do biofilme, com absorvâncias comparáveis às do branco experimental.
- A MIC não reflete o comportamento dos antimicrobianos em biofilme.

- Para infecções nosocomiais é necessário saber se o microrganismo envolvido é ou não produtor de biofilme para, com base na MBIC, usar conduta eficiente contra a bactéria e o biofilme.

7 Referências

AFONSO, I. F. *Modelagem Molecular e Avaliação da Relação Estrutura-Atividade Acoplados a Estudos Farmacocinéticos e Toxicológicos in silico de Derivados Heterocíclicos com Atividade Antimicrobiana*. Rio de Janeiro, 2008. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas). Universidade Federal do Rio de Janeiro.

AL-BAKRI, A. G.; OTHMAN, G.; BUSTANJI, Y. The Assessment of the Antibacterial and Antifungal Activities of Aspirin, EDTA and Aspirin-EDTA combination and their Effectiveness as Antibiofilm Agents. *Journal of Applied Microbiology*. 107, 280-286, 2009.

AMORENA, B.; GRACIA, E.; MONZÓN, M.; OTEIZA, C.; PÉREZ, M.; ALABART, J.L.; HERNÁNDEZ-YAGO, J. Antibiotic Susceptibility Assay for *S. aureus* in Biofilms Developed *in vitro*. *J. Antimicrob. Chemother.*, v. 44, p. 43-55, 1999.

ANTUNES, A. L. S.; TRENTIN, D. S.; BONFANTI, J. W.; PINTO, C. C. F.; PEREZ, L. R.; MACEDO, A. J.; BARTH, A. L. Application of a Feasible Method for Determination of Biofilm Antimicrobial Susceptibility in Staphylococci. *APMIS*, v.118, p.873-877, 2010.

ANWAR, H.; DASGUPTA, M. K.; COSTERTON, J. W. Testing the Susceptibility of Bacteria in Biofilms to Antibacterial Agents. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 34, n. 11, p. 2043-2046, 1990.

ANWAR, H.; STRAP, J. L.; COSTERTON, J. W. Establishment of Aging Biofilms: Possible Mechanism of Bacterial Resistance to Antimicrobial Therapy. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 36, n. 7, p. 1347-1351, 1992.

BAKKER-WOUDENBERG, I.A.J.M.; SCHIFFELERS, R.M.; TEN KATE, M.T.; STORM, G.; GUO, L.; WORKING, P. Targetin of Antibiotics in Bacterial Infection using Pegylated long-Circulation Liposomes. *J. Liposome. Res.*, v. 10, p. 513-521, 2000.

BAKKER-WOUDENBERG, I.A.J.M.; TEN KATE, M.T.; GUO, L.; WORKING, P.; MOUTON, J. W. Ciprofloxacin in Polyethylene Glycol-Coated Liposomes: Efficacy in Rat Models of Acute or Chronic *Pseudomonas aeruginosa* Infection. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 46, p. 2575-2581, 2002.

BALOTESCU, C.; ISRAIL, A.M.; LAZAR, V.; CERNAT, R.; PETRACHE, L.M.; DINU, C. Study of antibiotic influence on adherence capacity of gram positive and gram negative bacteria to the cellular substrate. *Bact. Virus. Paraz. Epidemiol.* v. 47, p. 131-135, 2002.

BARREIRO, E. J., FRAGA, C. A. M. *Química Medicinal: As Bases Moleculares da Ação dos Fármacos*. 2ªed. Porto Alegre: Editora Artmed, 2008.

BLEYER A.J.; MASON L.; RUSSELL G.; RAAD I.; SHERERTZ R.J. A randomized, controlled trial of a new vascular catheter flush solution

(minocycline-EDTA) in temporary hemodialysis access. *Infect. Control. Hosp. Epidemiol.* v. 26, p. 520-524, 2005.

BRUNTON, L. L., LAZO, J. S., PARKER K. L. *Goodman & Gilman: As Bases Farmacológicas da Terapêutica.* 11ªed. Rio de Janeiro: Editora McGrawHill, 2006.

COSTERTON, J.M. Introduction to Biofilm. *Int. J. Antimicrob. Agents.* 11, 217-221, 1999.

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

DUNNE, W. M. Effects of Subinhibitory Concentrations of Vancomycin or Cefamandole on Biofilm Production by Coagulase-Negative Staphylococci. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 34, p. 390-393, 1990.

DUNNE, W. M. Bacterial Adhesion: Seen Any Good Biofilms Lately? *Clinical Microbiology Reviews*, v. 15, p. 155-166, 2002.

DUNNE, W. M; MASON, E. O.; KAPLAN, S. L. Diffusion of Rifampin and Vancomycin through a *Staphylococcus epidermidis* Biofilm. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 37, n. 12, p. 2522-2526, 1993.

ELDER, M. J.; STAPLETON, F.; EVANS, E.; DART, J. K. Biofilm-related Infections in Ophthalmology. *Eye*, v. 9, p. 102-109, 1995.

FORREST, G.M.; TAMURA, K. Rifampin combination therapy for nonmycobacterial infections. *Clin. Microb. Reviews*. v. 23, p. 14-34, 2010.

FRANK, K.L., PATEL, R. Activity of Sodium Metabisulfite against Planktonic and Biofilm *Staphylococcus* species. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis*, v. 57. p. 355-59, 2007.

FRANK, K. L., REICHERT, E. J., PIPER, K. E., PATEL, R. In Vitro Effects of Antimicrobial Agents on Planktonic and Biofilm Forms of *Staphylococcus lugdunensis* Clinical Isolates. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 51, n. 3, p. 888-895, 2007.

GARLAND, J.S.; ALEX, C.P.; HENRICKSON, K.J.; MCAULIFFE, T.L.; MAKI, D.G. A vancomycin-heparin lock solution for prevention of nosocomial bloodstream infection in critically ill neonates with peripherally inserted central venous catheters: a prospective, randomized trial. *Pediatrics*. v. 116(2), p.198-205, 2005.

GAREY, K. W.; VO, Q. P.; LEWIS, R. E.; SAENGCHAROEN, W.; LAROCCO, M. T.; TAM, V. H. Increased bacterial adherence and biomass in *Pseudomonas aeruginosa* bacteria exposed to clarithromycin. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis*. v. 63(1), p.81-6, 2009.

HANCOCK, R. E. W. - Mechanisms of Action of Newer Antibiotics for Gram-positive Pathogens. *Lancet Infect. Dis.* v. 5, p. 209-218, 2005.

HENTZER, M.; TEITZEL, G.M.; BALZER, G.J.; HEYDORN, A.; MOLIN, S.; GIVSKOV, M.; PARSEK, M.R. Alginate overproduction affects *Pseudomonas aeruginosa* biofilm structure and function. *J Bacteriol.* v. 183, p. 5395-5401, 2001.

HIRAMATSU, K.; HANAOKI, H.; INO, T.; YABUTA, K.; OGURI, T.; TENOVER, F.C. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical strain with reduced vancomycin susceptibility. *J Antimicrob Chemother.* v.40, p.135-136, 1997.

ISHIDA, H., ISHIDA, Y., KUROSAKA, Y., OTANI, T., SATO, K., KOBAYASHI, H. In vitro and in vivo Activities of Levofloxacin Against Biofilm-Producing *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 42, p. 1641-1645, 1998.

JEFFERSON, K.K. What Drives Bacteria to Produce a Biofilm? *FEMS Microbiology Letters*, v. 236, p. 163-173, 2004.

KITE P.; EASTWOOD K.; SUGDEN S.; PERCIVAL S.L. Use of in vivo generated biofilms from hemodialysis catheters to test the efficacy of a novel antimicrobial catheter lock for biofilm eradication in vitro. *J Clin Microbiol.* v. 42, p. 3073-3076, 2004.

KIRISITS, M.J.; PROST, L.; STARKEY, M.; PARSEK, M.R. Characterization of colony morphology variants isolated from *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Appl Environ Microbiol.* v. 71, p. 4809-4821, 2005.

LAPLANTE, K.L.; MERMEL, L.A. In vitro Activities of Telavancin and Vancomycin against Biofilm-Producing *Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis* and *Enterococcus faecalis* Strains. *Antim. Agents and Chemoth.* v. 53, p. 3166-3169, 2009.

LINARES, J.F.; GUSTAFSSON, I.; BAQUERO, F.; MARTINEZ, J. L. Antibiotics as Intermicrobial Signaling Agents Instead of Weapons. *PNAS*, v. 103, p. 19484-19489, 2006.

LIVERMORE, D.M. Of *Pseudomonas*, porins, pumps and carbapenems. *J Antimicrob Chemother.* v. 47, p. 247-250, 2001.

MARR, A.K.; OVERHAGE, J.; BAINS, M.; HANCOCK, R.E. The Ion protease of *Pseudomonas aeruginosa* is induced by aminoglycosides and is involved in biofilm formation and motility. *Microbiology.* v.153, p. 474-482, 2007.

MOFFAT, A. C.; OSSELTON, M. D.; WIDDOP, B.; GALICHET, L. Y. *Clarke's Analysis of Drugs and Poisons*. 3rded. v. 2. London: Pharmaceutical Press, 2003.

MONZON, M.; OTEIZA C.; LEIVA J.; LAMATA M.; AMORENA B. Biofilm testing of *Staphylococcus epidermidis* clinical isolates: low performance of vancomycin

in relation to other antibiotics. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* v. 44, p. 319–324, 2002.

MONZÓN, M.; OTEIZA, C.; LEIVA, J.; AMORENA, B. Synergy of Different Antibiotic Combinations in Biofilms of *Staphylococcus epidermidis*. *J. Antimicrob. Chemother.* v. 48, p. 793-801, 2001.

OTTO, M. *Staphylococcus epidermidis* – The ‘accidental’ pathogen. *Nature Reviews*, v. 7, p. 555-567, 2009.

PACE, J. L., RUPP, M. E., FINCH, R. G. *Biofilms, Infection, and Antimicrobial Therapy*. New York: Taylor & Francis Group, 2006.

PATEL, R. Biofilms and Antimicrobial Resistance. *Clin. Orthop Relat. Res.*, v. 437, p. 41-47, 2005.

PERCIVAL, S.L.; KITE, P.; EASTWOOD, K.; MURGA, R.; CARR, J.; ARDUINO, M.J.; DOLAN, R.M. Tetrasodium EDTA as a Novel Central Venous Catheter Lock Solution Against Biofilm. *Infect. Control. Hosp. Epidemiol.* v. 26, p. 515-519, 2005.

PINTO, C. C. F. *Comparação da Eficácia da Vancomicina e Rifampicina em Staphylococcus spp. através da Concentração Inibitória Mínima em Biofilme e em Células Planctônicas – Porto Alegre – Rio Grande do Sul*. Porto Alegre, 2008. Monografia de Conclusão de Curso (Farmácia), Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Dados não publicados.

PRESTERL, E., HAJDU, S., LASSNIGG, A. M., HIRSCHL, A. M., HOLINKA, J., GRANINGER, W. Effects of Azitromycin in Combination with Vancomycin, Daptomycin, Fosfomycin, Tigecycline, and Ceftriaxone on *Staphylococcus epidermidis* Biofilms. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 53, n. 8, p. 3205-3210, 2009.

QUINN, J.P. *Pseudomonas aeruginosa* infections in the intensive care unit. *Semin Respir Crit Care Med*. v. 24, p. 61-68, 2003.

RAAD, I.; BUZAID, A.; RHYNE, J.; HACHEM, R.; DAROUICHE, R.; SAFAR, H.; ALBITAR, M.; SHERERTZ, R. J. Minocycline and Ethylenediaminetetraacetate for the Prevention of Recurrent Vascular Catheter Infections. *Clin. Infect. Dis.*, v. 25, p. 149-151, 1997.

RAAD, I.; ALRAHWAN, A.; ROLSTON, K. *Staphylococcus epidermidis*: Emerging Resistance and Need for Alternative Agents. *Clin. Infect. Dis.*, v.26, p. 1182-1187, 1998.

RAAD, I.; CHATZINIKOLAOU, I.; CHAIBAN, G.; HANNA, H.; DVORAK, T.; COOK, G.; COSTERTON, W. In vitro an ex vivo Activities of Minocycline and EDTA Against Microorganisms Embedded in Biofilm on Catheter Surfaces. *Antim. Agents. Chemother.* v. 47, p. 3580-3585, 2003.

RAAD, I.; HANNA, H.; JIANG, Y.; DVORAK, T.; REITZEL, R.; CHAIBAN, G.; SHERERTZ, R.; HACHEM, R. Comparative Activities of Daptomycin, Linezolid, and Tigecycline against Catheter-Related Methicillin-Resistant *Staphylococcus* Bacteremic Isolates Embedded in Biofilm. *Antim. Agents. Chemother.*, v. 51, p. 1656-1660, 2007a.

RAAD, I.; HANNA, H.; MAKI, D. Intravascular catheter-related infections: Advances in Diagnosis, prevention, and management. *Lancet Infect. Dis.*, v. 7, p. 645-657, 2007b.

ROSS, C. *Análise Microbiológica de Pontas de Cateteres Venosos Centrais de Pacientes do Hospital Universitário – Londrina – Paraná*. Londrina, 2006. Tese (Doutorado em Microbiologia) Universidade Estadual de Londrina.

SCHADOW, K. H., SIMPSON, W. A., CHRISTENSEN, G. D. Characteristics of Adherence to Plastic Tissue Culture Plates of Coagulase-Negative Staphylococci Exposed to Subinhibitory Concentrations of Antimicrobial Agents. *J. Infect. Dis.*, v. 157, p. 71-77, 1988.

SIGMAN, D. S. Chemical Nucleases. *Biochemistry.* v. 29, p. 9097-9105, 1990.

SINGH, P.K.; SCHAEFER, A.L.; PARSEK, M.R.; MONINGER, T.O.; WELSH, M.J.; GREENBERG, E.P. Quorum-sensing signals indicate that cystic fibrosis lungs are infected with bacterial biofilms. *Nature.* v. 407, p. 762-764, 2000.

SOUZA, L. B. G.; FIGUEIREDO, B. B. Prevalência de Infecções Nosocomiais Provocadas por *Staphylococcus aureus* Resistente à Meticilina (MRSA), no Hospital Universitário Regional de Maringá. *Revista Brasileira de Análises Clínicas*, v. 40, n. 1, p. 31-34, 2008.

STAPPER, A.P.; NARASIMHAN, G.; OHMAN, D.E.; BARAKAT, J.; HENTZER, M.; MOLIN, S.; KHARAZMI, A.; HOIBY, N.; MATHEE, K. Alginate production affects *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development and architecture, but is not essential for biofilm formation. *J Med Microbiol.* v. 53, p. 679-690, 2004.

STEPANOVIĆ, S.; VUKOVIĆ, D.; HOLA, V.; BONAVENTURA, G.; DJUKIĆ, S.; ĆIRKOVIĆ, I.; RUZICKA, F. Quantification of Biofilm in Microtiter Plates: Overview of testing Conditions and Practical Recommendations for Assessment of Biofilm Production by staphylococci. *APMIS* 115, p. 891-899, 2007.

SUCI, P. A.; MITTELMAN, M. W.; YU, F. P.; GEESEY, G. G. Investigation of Ciprofloxacin Penetration into *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 38, p. 2125-2133, 1994.

WRIGHT, G. D. The Antibiotics Resistome: the Nexus of Chemical and Genetic Diversity. *Nature Reviews*, v. 5, n. 175-186, 2007.

TENOVER, F. C.; JONES, R. N.; SWENSON, J. M.; ZIMMER, B.; MCALLISTER, S.; JORGENSEN, H. Methods for Improved Detection of Oxacillin Resistance in

Coagulase-Negative staphylococci: Result of a Multicenter Study. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 37, n. 12, p. 4051-4058, 1999.

ZHENG, Z.; STEWART, P. S. Penetration of Rifampin through *Staphylococcus epidermidis* Biofilms. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 46, n. 3, p. 900-903, 2002.

ZIEBUHR, W.; HEILMANN, C.; GÖTZ, F.; MEYER, P.; WILMS, K.; STRAUBE, E.; HACKER, J. Detection of the Intercellular Adhesion Gene Cluster (*ica*) and Phase Variation in *Staphylococcus epidermidis* Blood Culture Strains and Mucosal Isolates. *Infect. Immunity*, v. 65, p. 890-896, 1997.